

Ю. Г. Приседський

ВЕЛИКИЙ ПРАКТИКУМ

З ФІЗІОЛОГІЇ
ТА БІОХІМІЇ РОСЛИН
(БІОХІМІЧНІ МЕТОДИ
ДОСЛІДЖЕНЬ)



**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ДОНЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ВАСИЛЯ СТУСА**

Ю. Г. Приседський

**ВЕЛИКИЙ ПРАКТИКУМ
З ФІЗІОЛОГІЇ ТА БІОХІМІЇ РОСЛИН
(БІОХІМІЧНІ МЕТОДИ
ДОСЛІДЖЕНЬ)**

Навчальний посібник

Видання друге, перероблене та доповнене

Вінниця • «ТВОРИ» • 2022

УДК 581.19:58.08

П77

*Рекомендовано до друку Вченою радою
Донецького національного університету імені Василя Стуса
(протокол № 9 від 28 січня 2022 р.)*

Рецензенти:

Лихолат Ю. В. – д-р біол. наук, професор, завідувач кафедри фізіології та інтродукції рослин Дніпровського національного університету імені Олеся Гончара;

Кур'ята В. Г. – д-р біол. наук, професор, професор кафедри біології Вінницького державного педагогічного університету імені Михайла Коцюбинського.

Приседський Ю. Г.

П77 Великий практикум з фізіології та біохімії рослин (біохімічні методи досліджень): навчальний посібник. Видання друге, перероблене та доповнене / Ю. Г. Приседський. Вінниця : ТВОРИ, 2022. 418 с.

ISBN 978-617-552-335-3

Навчально-методичний посібник містить теоретичні відомості, які стосуються приготування розчинів, принципів методів кількісного аналізу хімічних речовин – складників рослинного організму та відомості про будову і властивості вуглеводів, білків, нуклеїнових кислот, ліпідів та речовин вторинного походження. У практичній частині наведені методи визначення кількості мінеральних елементів, цукрів, білків, нуклеїнових кислот та вітамінів; аналізу активності деяких ферментів; біохімічних особливостей ліпідів і фітогормонів.

Означені методи широко використовуються у науково-дослідній роботі здобувачів вищої освіти та здобувачів освіти ступеня філософії, викладачів, наукових співробітників.

УДК 581.19:58.08

ISBN 978-617-552-335-3

© Приседський Ю. Г., 2022

© ДонНУ імені Василя Стуса, 2022

ВСТУП

Спецкурси «Великий практикум» та «Практикум за спеціалізацією» є важливим етапом підготовки фахівців з фізіології та біохімії рослин. Під час виконання робіт, передбачених планом практичних занять, здобувачі вищої освіти опановують методи визначення вмісту різноманітних органічних та мінеральних речовин, що входять до складу рослинних організмів, аналізу активності окисно-відновних, гідролітичних та протеолітичних ферментів, з'ясуванню впливу умов зовнішніх чинників на рослини тощо. Під час підготовки до захисту виконаних робіт здобувачі вищої освіти також закріплюють теоретичні знання, отримані під час вивчення курсів «Фізіологія та біохімія рослин», «Біохімія», «Обрані розділи фізіології рослин», «Загальна хімія» тощо.

Набуті знання та вміння допомагають майбутнім фахівцям правильно обирати та застосовувати методи біохімічного аналізу рослин, свідомо використовувати методи залежно від різних обставин (наприклад, наявності реактивів або обладнання). У посібнику наведено відомості про принципи методів аналітичного визначення складу рослин, будову, структуру та властивості біоорганічних молекул, способи розрахунку та приготування розчинів, необхідних для проведення аналізів рослинних об'єктів, методи визначення вмісту мінеральних елементів, цукрів, білків, амінокислот, вітамінів, нуклеїнових кислот, вивчення активності ферментів. Ці методи базуються на різних принципах і потребують обладнання та реактивів різної складності і різної фахової підготовки.

Посібник може використовуватися не тільки здобувачами вищої освіти. Він може бути корисним і для та здобувачів освіти ступеня філософії, а також науковців у галузі фізіології та біохімії рослин, екології рослин.

ПРАВИЛА РОБОТИ ТА ЗАПОБІЖНІ ЗАХОДИ ПІД ЧАС РОБОТИ У БІОХІМІЧНІЙ ЛАБОРАТОРІЇ

Під час виконання лабораторних робіт із великого практикуму з фізіології та біохімії рослин необхідно дотримуватись правил роботи в біохімічній лабораторії:

1. Під час виконання робіт у хімічній лабораторії студенти повинні бути одягнені у халати з бавовняної тканини.

2. Складний посуд, у якому зберігаються реактиви, сухі речовини, кислоти і луги, повинний бути ретельно закритий для запобігання їх розкладанню, випаровуванню та потраплянню у них забруднень.

3. На всіх посудинах із реактивами повинні бути наклеєні етикетки зі вказівкою назви реактиву і дати його приготування.

4. Забороняється збереження розчинів у мірчому посуді (мірчих колбах, циліндрах та ін.), які використовуються тільки для приготування реактивів і виміру їх об'єму.

5. Для збереження реактивів чистими залишки невикористаних речовин не можна повертати в ті банки, з яких вони бралися.

6. Із леткими речовинами (соляна кислота, аміак, сірчаний ефір, фенол тощо) необхідно працювати тільки під витяжною шафою.

7. Готуючи розчини у мірчому посуді, доливати розчинник до мітки можна тільки після повного розчинення речовини. Приготований розчин ретельно перемішують.

8. Після відкривання банки або склянки з реактивом пробку варто тримати в руці або класти її на стіл зовнішньою поверхнею.

9. Перш ніж набрати розчин чистою піпеткою або циліндром, їх необхідно обполоснути цим розчином.

10. Для виміру об'єму реактивів, що часто використовуються в лабораторній практиці, бажано мати для кожного з них підписаний циліндр або піпетку.

11. Необхідно пам'ятати, що для розведення концентрованих кислот потрібно доливати кислоту у воду, а не навпаки.

12. Розливу кислоту нейтралізують лугом, а потім змивають великою кількістю води.

13. Хімічний порцеляновий та скляний посуд під час нагрівання потрібно ставити на азбестову сітку. Під час використання водяної бані необхідно стежити за рівнем води у ній.

14. Під час роботи в лабораторії з отруйними речовинами (ртуть, феноли тощо) необхідно дотримуватись правил техніки безпеки.

15. Не можна залишати в лабораторії без догляду включені електровимірювальні та електронагрівальні прилади.

16. Забороняється працювати в лабораторії без захисного одягу (бавовняних халатів).

17. У лабораторіях не можна тримати верхній одяг.

18. Забороняється виконувати роботи, знаходячись наодинці. Обов'язкова присутність мінімум двох людей.

1. ОСНОВНІ ПОНЯТТЯ ПРО РОЗЧИНИ

Більшість реактивів, які застосовуються для біохімічного аналізу рослин, використовуються у вигляді розчинів. Концентрації розчинів зазвичай виражають у вагових (для сипучих) та об'ємних (для рідин) відсотках, у молях і грам-еквівалентах, які містяться у певній кількості розчину.

1.1. ПОЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЙ РЕЧОВИН У ХІМІЧНОМУ АНАЛІЗІ

Розрізняють два типи позначень концентрацій речовин – *аналітичні* і *технічні*. Аналітичні позначення вживають для розчинів реагентів, застосовуваних у аналізі речовин. Як основну масову одиницю речовин використовують моль.

Аналітичні концентрації

Молярна концентрація (M) – число молів n розчиненої речовини, яке міститься в 1 000 см³ або 1 дм³ (л) розчину:

$$M = \frac{n_A \times 1\,000}{V},$$

де V – об'єм розчину, см³;

n_A – маса речовини.

Молярна концентрація (M_A) – число молів розчиненої речовини, яке приходить на 1 кг розчинника:

$$M_A = \frac{n_A \times 1\,000}{q},$$

q – маса розчинника, кг.

Еквівалентна, або нормальна, концентрація (N) – число еквівалентів n_e розчиненої речовини, яке міститься у 1 дм³ розчину:

$$N = \frac{n_e \times 1\,000}{V}.$$

Масова еквівалентність (масова нормальність) (XЭ). – число молів розчиненої речовини, яке приходить на 1 кг розчинника (q_p):

$$X_e = \frac{n_e \times 1\,000}{q_p}.$$

Рідше застосовують молярне співвідношення – кількість молів речовини, яке міститься у 100 молях розчинника; молярну частку – кількість молів речовини відносно загальної кількості молів розчину (у частках або у %); розведення – об'єм (у дм³ розчину, який містить 1 моль або 1 кг речовини). На практиці титриметричного аналізу для зручності розрахунків концентрацію виражають у виді титру розчину. *Титр* – маса розчиненої речовини у грамах, яка міститься в

1 см³ розчину. Титр відповідності, або титр за речовиною, яка визначається, – маса речовини, що визначається, у грамах, яка взаємодіє з 1 см³ цього розчину.

Технічні концентрації

Технічні позначення концентрацій широко поширені в техніці, медицині, фармації. Розглянемо найбільш уживані.

Масова процентна концентрація (%) – маса розчиненої речовини у грамах q_A , що знаходиться у 100 г розчину або суміші (q_p – маса розчинника):

$$C = \frac{q_A \times 100}{(q_A + q_p)}.$$

Об'ємна процентна концентрація (градус, %) – об'єм розчиненої речовини в кубічних сантиметрах V_A , що знаходиться в 100 см³ розчину або суміші (V_p – об'єм розчинника):

$$C = \frac{V_A \times 100}{(V_A + V_p)}.$$

Мас-об'ємна процентна концентрація (%) – маса речовини у грамах q_A , яка знаходиться у 100 см³ розчину (V – об'єм розчину):

$$C = \frac{q_A \times 100}{V}.$$

Рідше вживають масове співвідношення – масу речовини у грамах, що приходить на 1 г розчинника; масову частку – масу речовини у грамах у загальній масі суміші; масове розведення – масу суміші у грамах, що приходить на 1 г речовини.

Міліпроцентні концентрації – позначення концентрації в тисячних частинах відсотка.

Найчастіше у біохімічному аналізі застосовуються процентні, молярні та нормальні (еквівалентні) концентрації розчинів.

1.2. РОЗРАХУНОК НАВАЖОК РЕЧОВИН ДЛЯ ПРИГОТУВАННЯ РОЗЧИНІВ

Процентна концентрація

Студенти часто припускаються помилки у визначенні процентної концентрації, відносячи кількість розчиненої речовини не до маси розчину, а в більшості випадків до його об'єму або до маси розчинника. Тому обчислення процентної концентрації розчинів варто починати з задач, у яких указується маса розчину і маса розчиненої речовини. Потім розв'язують задачі на приготування процентної концентрації за масою: а) розчинника і розчиненої речовини; б) розчину і розчинника.

Приклад 1. У якій кількості води необхідно розчинити 40 г речовини, щоб отримати 5 % розчин?

Розв'язання

Перший спосіб

Якщо для розчинення 5 г речовини потрібно 95 г води, то для розчинення 40 г речовини необхідно взяти X г води:

$$X = \frac{40 \times 95}{5} = 760 \text{ г.}$$

Другий спосіб

1. Визначають, масу розчину, якщо 40 г речовини складають 5 % від його маси:

$$X = \frac{40 \times 100}{5} = 800 \text{ г.}$$

2. Розраховують, скільки грамів води міститься у 800 г розчину:

$$800 - 40 = 760 \text{ г води.}$$

Приклад 2. Скільки мілілітрів 96 % сірчаної кислоти густиною 1,84 г/мл і води буде потрібно для приготування 400 мл 20 % її розчину, який має густину 1,15 г/мл?

Розв'язання

1. Розраховують масу 400 мл 20 % розчину сірчаної кислоти густиною 1,15 г/мл:

$$400 \text{ мл} \times 1,15 \text{ г/мл} = 460 \text{ г.}$$

2. Визначають, скільки безводної сірчаної кислоти міститься в 460 г цього розчину:

у 100 г розчину міститься 20 г H_2SO_4 ,

а в 460 г -" -" -" X г,

$$X = \frac{460 \times 20}{100} = 92 \text{ г } \text{H}_2\text{SO}_4.$$

3. Обчислюють, у якій кількості грамів 96 % сірчаної кислоти буде міститися 92 г безводної кислоти:

у 100 г розчину міститься 96 г безводної H_2SO_4 ,

у X г -" -" -" 92 г -" -",

$$X = \frac{100 \times 92}{96} = 95,8 \text{ г.}$$

4. Дізнаються, який об'єм займе 95,8 г розчину сірчаної кислоти, густина якої 1,84 г/мл:

$$V = \frac{p}{\rho} = \frac{95,8}{1,84} = 25,06 \text{ мл.}$$

5. Визначають, скільки грамів води буде потрібно для приготування 400 мл 20 % сірчаної кислоти з 95,8 г 96 % розчину кислоти:

$$460 - 95,8 = 364,4 \text{ г.}$$

6. Розраховують, який об'єм займуть 364,2 г води:

$$V = \frac{p}{\rho} = \frac{364,4}{1} = 364,4 \text{ мЛ.}$$

Процентні розчини є приблизними, тому наважку речовини зазвичай беруть на технікохімічних терезах, а об'єм вимірюють мірними циліндрами.

Приклад 3. Скільки потрібно взяти кристалічної безводної солі Na_2CO_3 для приготування 100 мл 10 % розчину Na_2CO_3 , густина якого 1,1 г/мл³?

Розв'язання

1. Спочатку дізнаються масу 100 мл 10 % розчину, використовуючи формулу $P = V\rho$:

$$P = 100 \text{ мл} \times 1,1 \text{ г/л} = 110 \text{ г розчину.}$$

2. Визначають, яку кількість грамів Na_2CO_3 потрібно взяти, щоб приготувати 110 г 10 % розчину. Потрібну кількість цієї солі розраховують за пропорцією:

у 100 г розчину міститься 10 г Na_2CO_3 ,

а в 110 г - " - " - X г,

$$X = \frac{110 \times 10}{100} = 11 \text{ г } Na_2CO_3.$$

Приклад 4. Скільки необхідно взяти кристалічної водної солі $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ для приготування 100 мл 10 % розчину Na_2CO_3 , густина якого складає 1,1 г/мл³?

Розв'язання

1. Визначають масу 100 мл 10 % розчину за формулою $P = V\rho$:

$$P = 100 \text{ мл} \times 1,1 \text{ г/мл} = 110 \text{ г розчину.}$$

2. Обчислюють, скільки потрібно взяти безводної солі Na_2CO_3 для приготування 10 % розчину:

у 100 г розчину міститься 10 г Na_2CO_3 ,

а в 110 г -" - -" - X г,

$$X = \frac{110 \times 10}{100} = 11 \text{ г } Na_2CO_3.$$

3. Як бачимо, для приготування 10 % розчину безводної солі, молекулярна маса якої дорівнює 106, необхідно 11 г, а водної солі $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (мол. маса = 286) потрібно:

$$X = \frac{286 \times 11}{106} = 29,7 \text{ г } Na_2CO_3 \cdot 10H_2O.$$

Приклад 5. Скільки потрібно взяти 50 % розчину КОН ($\rho = 1,51$ г/мл), щоб приготувати 100 мл 12 % КОН, густина якого складає 1,110 г/мл?

Розв'язання

1. Визначають масу 100 мл 12 % розчину КОН, використовуючи формулу $P = V\rho$: $P = 100 \text{ мл} \times 1,110 \text{ г/мл} = 111 \text{ г}$.

2. Потім проводять розрахунок із приготування 12 % розчину КОН. Обчислюють, скільки грамів КОН необхідно взяти, щоб приготувати 111 г 12 % розчину:

100 г розчину містить 12 г КОН,

111 г -" -" -" X г КОН,

$$X = \frac{111 \times 12}{100} = 13,32 \text{ г КОН.}$$

3. Далі розраховують, у якій кількості грамів 50 % КОН міститься 13,32 г КОН. Складають пропорцію:

50 г КОН міститься у 100 г розчину,

13,32 г -" -" у X г -",

$$X = \frac{13,32 \times 100}{50} = 26,64 \text{ г.}$$

4. Оскільки зважування концентрованих лугів і кислот заборонено правилами техніки безпеки, то отриману масу розчину необхідно перевести в об'ємні одиниці, використовуючи формулу:

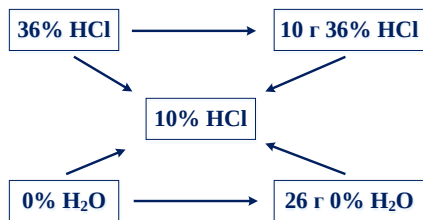
$$V = \frac{P}{\rho} = \frac{26,64}{1,51} = 17,64 \text{ мл розчину КОН.}$$

Отже, для приготування 12 % розчину КОН з 50 % необхідно взяти в циліндр 17,64 мл 50 % розчину КОН і довести обережно об'єм дистильованою водою до мітки 100 мл.

Такі розрахунки можна робити за **правилом «хреста»**, або **змішування**. Сутність цього методу полягає в тому, що уявляють перед собою квадрат, у верхньому лівому куті якого записують відому концентрацію розчину, у центрі квадрата – ту концентрацію розчину, яку потрібно одержати, у лівому нижньому куті – концентрацію води (прийнята за 0) або концентрацію розчинника. Потім роблять вирахування за діагоналями квадрата з верхнього лівого кута до нижнього правого, отриману різницю між двома числами записують у нижньому правому куті. У правому верхньому куті записують різницю, отриману між числом, що знаходиться в центрі квадрата, і числом, що знаходиться в лівому нижньому куті. Отримані різниці показують, скільки вагових частин вихідного процентного розчину і розчинника (води) необхідно узяти для приготування потрібного розчину.

Приклад 7. Приготувати 100 мл 10 % розчину HCl із концентрованого 36 % розчину HCl, що має густину 1,18 г/мл.

Розв'язання



Для розв'язання задачі застосовують правило «хреста». Після одержання різниць між концентраціями за діагоналями квадрата обчислення ведуть так: для одержання 10 % розчину HCl необхідно взяти 10 г 36 % розчину HCl та 26 г дистильованої води (разом буде

отримано 36 г розчину, а потрібно 100 мл).

1. Насамперед обчислюють, скільки будуть важити 100 мл 10 % розчину HCl. Для цього скористаємось формулою:

$$P = V \times \rho = 100 \times 1,049 = 104,9 \text{ г.}$$

2. Далі, використовуючи пропорції, обчислюють кількість 36 % соляної кислоти для приготування 104,9 г 10 % розчину:

$$X = \frac{104,9 \times 10}{36} = 29,1 \text{ г HCl.}$$

3. Після цього розраховують об'єм 36 % розчину HCl:

$$V = \frac{P}{\rho} = \frac{29,1}{1,18} = 24,66 \text{ мл.}$$

Тобто для приготування 100 мл 10 % розчину HCl потрібно відміряти 24,66 мл 36 % соляної кислоти та довести її об'єм до 100 мл.

Можна розрахувати цей показник і іншим шляхом:

1. Спочатку обчислюють, який об'єм 36 г 10 % розчину HCl:

$$V = \frac{P}{\rho} = \frac{36}{1,049} = 34,3 \text{ мл.}$$

2. Далі – який об'єм 36 % соляної кислоти необхідний для приготування 34,3 мл 10 % HCl:

$$V = \frac{P}{\rho} = \frac{10}{1,19} = 8,47 \text{ мл.}$$

3. Виходить, для приготування 10 % розчину HCl потрібно відміряти циліндром 8,47 мл 36 % HCl і 26 мл H₂O. Загальний об'єм розчину складає 34,3 мл, а за умовою задачі необхідно приготувати 100 мл розчину. Складають пропорцію і визначають, яку кількість мл концентрованої кислоти потрібно взяти, щоб одержати 100 мл розчину:

$$X = \frac{100 \times 8,47}{34,3} = 24,67 \text{ мл.}$$

Молярна концентрація

Розглянемо правила приготування молярних концентрацій деяких речовин.

Приклад 1. Приготувати 1 л 1 М розчину NaCl.

Розв'язання

Спочатку підраховують молекулярну масу NaCl, вона дорівнює 58,5 г. Сіль відважують на аналітичних вагах і розчиняють у мірчій колбі на 1 л. Після розчинення солі об'єм розчину в колбі доводять дистильованою водою до мітки 1 л. Розчин перемішують і виливають у посудину, де він повинен зберігатися. Якщо потрібно приготувати більш розведений розчин (0,1 або 0,01 М), відважують відповідно 0,1 або 0,01 моль солі і розчиняють водою у мірчій колбі на 1 л.

Приклад 2. Приготувати 150 мл 1 М розчину NaCl.

Розв'язання

Заходять молекулярну масу NaCl, яка становить 58,5. Потім складають пропорцію та обчислюють, яку кількість грамів солі потрібно взяти, щоб приготувати 150 мл розчину:

у 1 000 мл міститься 58,5 г NaCl,

у 150 мл "- X г NaCl,

$$X = \frac{150 \times 58,5}{1\,000} = 8,75 \text{ г.}$$

Відважують на аналітичних вагах 8,775 г NaCl, розчиняють у дистильованій воді і доводять об'єм цим самим розчинником до мітки 150 мл.

Приклад 3. Приготувати 1 л 0,2 М розчину H₂SO₄, використовуючи концентровану сірчану кислоту (96 %, густина 1,84 г/мл).

Розв'язання

1. Визначають, скільки грамів безводної сірчаної кислоти міститься у 1 л 0,2 М розчину H₂SO₄. Для цього складають пропорцію:

1 М H₂SO₄ містить 98 г H₂SO₄,

0,2 М "- X г,

$$X = \frac{98 \times 0,2}{1} = 19,6 \text{ г.}$$

2. Обчислюють, у якій кількості 96 % сірчаної кислоти міститься 19,6 г безводної сірчаної кислоти:

у 100 г розчину H₂SO₄ міститься 96 г безводної H₂O₄,

у X г "- "- 19,6 г "- "-,

$$X = \frac{19,6 \times 100}{96} = 20,41 \text{ г.}$$

3. Розраховують, який об'єм займають 20,41 г 96 % розчину H₂SO₄:

$$V = \frac{20,41}{1,84} = 11,09 \text{ мл.}$$

Отже, для приготування 1 л 0,2 М розчину H_2SO_4 потрібно в мірчу колбу на 1 л налити 100–200 мл дистильованої води, а потім обережно по стінці колби влити 11,09 мл 96 % H_2SO_4 , перемішати, якщо розчин гарячий, охолодити до кімнатної температури і довести водою до мітки 1 л.

Нормальна концентрація

Для приготування нормальних розчинів потрібно знати грам-еквівалент цієї речовини, що знаходять шляхом ділення молекулярної маси кислоти, основи або солі відповідно на основність кислоти, кислотність лугу, на валентність металу або ж враховують характер окисно-відновних реакцій і умови змін ступеню окислення.

Приклад 1. Приготувати 350 мл 0,1 N розчину Na_2SO_4 .

Розв'язання

1. Визначають молекулярну масу і грам-еквівалент Na_2SO_4 .

$$M \text{ Na}_2\text{SO}_4 = 142. \text{ Грам-еквівалент} = M/2 = 142/2 = 71.$$

2. Складають пропорцію і обчислюють кількість грамів Na_2SO_4 , яку необхідно взяти, щоб приготувати 0,1 N розчину Na_2SO_4 :

у 1 N розчині міститься 71 г Na_2SO_4 ,

у 0,1 N -" -" -" X г Na_2SO_4 ,

$$X = \frac{71 \times 0,1}{1} = 7,1 \text{ г.}$$

3. Розраховують кількість грамів солі, яку потрібно взяти, щоб приготувати 350 мл 0,1 N розчину Na_2SO_4 :

у 1 000 мл 0,1 N розчину розчинено 7,1 г Na_2SO_4 ,

у 350 мл -" -" -" X г Na_2SO_4 ,

$$X = \frac{7,1 \times 350}{1000} = 2,45 \text{ г.}$$

Виходить, для приготування 350 мл 0,1 N розчину Na_2SO_4 потрібно відважити на електроаналітичних терезах 2,485 г солі, розчинити у воді і довести об'єм розчину водою до 350 мл.

Приклад 2. Приготувати 1 л 0,2 N розчину КОН.

Розв'язання

1. Установлюють молекулярну масу і грам-еквівалент КОН:

$$M = 56 \text{ грам-еквівалент} = M/1 = 56/1 = 56 \text{ г.}$$

2. Визначають, яку кількість грамів КОН потрібно взяти, щоб приготувати 0,2 N КОН:

1 л 1 N розчину містить 56 г КОН,

1 л 0,2 N -" -" -" X г КОН X,

$$X = \frac{56 \times 0,2}{1} = 11,2 \text{ г.}$$

Отже, для приготування 1 л 0,2 N розчину КОН потрібно взяти наважку КОН у кількості 11,2 г, перенести в мірчу колбу на 1 л, розчинити у дистильованій воді і довести об'єм до мітки 1 л.

Приклад 3. Приготувати 1 л 0,1 N розчину H_2SO_4 , використовуючи 96 % сірчану кислоту, густина якої 1,84 г/мл.

Розв'язання

1. Установлюють молекулярну масу і грам-еквівалент H_2SO_4 :

М H_2SO_4 = 98 г. Грам-еквівалент = $98/2 = 49$ г, а 0,1 грам-еквівалента складає 4,9 г H_2SO_4 . Це означає, що 1 л розчину повинен містити 4,9 г H_2SO_4 .

2. Обчислюють, яку кількість грамів концентрованої сірчаної кислоти потрібно взяти, щоб у ній містилося 4,9 г H_2SO_4 :

$$\begin{array}{ccccccc} \text{у } 100 \text{ г } 96 \% \text{ розчину } \text{H}_2\text{SO}_4 \text{ міститься } 96 \text{ г безводної } \text{H}_2\text{SO}_4, \\ \text{у } X \text{ г} & \text{"-" } & \text{"-" } & \text{"-" } & \text{"-" } & 4,9 \text{ г} & \text{"-" } & \text{H}_2\text{SO}_4, \\ X = \frac{4,9 \times 100}{96} = 5,1 \text{ г.} \end{array}$$

Через те, що для приготування розчинів кислот у масових одиницях вони не беруться, а тільки в об'ємних, необхідно масові одиниці перетворити на об'ємні. Для цього використовують формулу:

$$V = \frac{P}{\rho} = \frac{5,1}{1,84} = 2,77 \text{ мл.}$$

Отже, для приготування 1 л 0,1 N розчину H_2SO_4 беруть мірчу колбу на 1 л, наливають у неї 200–300 мл дистильованої води, а потім обережно по стінці колби доливають 2,77 мл концентрованої сірчаної кислоти, перемішують і доводять водою об'єм до мітки 1 л.

ПИТАННЯ ТА ЗАВДАННЯ ДЛЯ ПЕРЕВІРКИ ЗНАНЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Які вираження концентрацій розчинів належать до аналітичних, а які – до технічних?
2. Дайте характеристику аналітичним концентраціям. Чим молярна та еквівалентна концентрації відрізняються від молярної та масової еквівалентності?
3. Дайте характеристику технічним концентраціям. Чим процентна концентрація відрізняється від об'ємної та мас-об'ємної концентрації?
4. Наведіть методики обчислення процентної концентрації розчинів.
5. Проведіть необхідні обчислення для приготування розчинів:
➤ 200 мл 25 % розчину FeSO_4 ;

- 150 мл 15 % розчину H_2SO_4 ;
- 250 мл 10 % розчину сахарози.

6. Користуючись правилом «хреста», зробіть необхідні розрахунки для приготування розчинів:

- 100 мл 15 % розчину NaOH з 50 % розчину (розчинник – вода);
- 150 мл 80 % спирту з 96 % спирту (розчинник – вода);
- 120 мл 10 % розчину HCl із 36 % та 5 % розчину HCl .

7. Проведіть необхідні розрахунки для приготування розчинів із молярною концентрацією:

- 500 мл 1 М розчину сірчаної кислоти;
- 250 мл 0,05 М розчину NaOH ;
- 700 мл 0,15 М розчину Na_2HPO_4 .

8. Проведіть необхідні розрахунки для приготування розчинів із нормальною (еквівалентною) концентрацією:

- 200 мл 0,1 N розчину ортофосфornoї кислоти;
- 300 мл 0,05 N розчину KOH ;
- 500 мл 0,5 N розчину K_3PO_4 .

9. Чому для приготування розчинів кислот та лугів (якщо використовуються концентровані їх розчини) потрібно проводити перерахунок маси на об'єм?

2. ПРИНЦИПИ ДЕЯКИХ МЕТОДІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

Кількісний аналіз широко застосовується в біології, фармацевтиці, медицині, є складником фармакопейного аналізу будь-якого лікарського засобу. Аналітики рекомендують таке формулювання: кількісний аналіз речовини – експериментальне визначення (вимірювання) концентрації (кількості) хімічних елементів (сполук) або їх форм в аналізованій речовині, вираженої у вигляді границь довірчого інтервалу або числа із зазначенням стандартного відхилення.

Методи кількісного аналізу класифікують у такий спосіб:

- хімічні,
- фізико-хімічні,
- фізичні,
- біологічні.

Історично першими кількісними методами стали хімічні – гравіметричний аналіз і титриметричний аналіз. Ці методи аналізу називають класичними. Вони були і залишилися високоточними, простими у виконанні, характеризуються високою відтворюваністю. Недоліком гравіметрії, порівняно з титриметрією, є значна тривалість аналізу; водночас великою перевагою є вища точність.

Технічний прогрес і розвиток самої аналітики видозмінив ці методи. Найбільші переваги класичних методів збереглися у фізико-хімічних методах аналізу: електрогравіметрія, фотометричне, потенціометричне, кулонометричне, амперометричне, кондуктометричне титрування.

Класичні методи аналізу і фізико-хімічні, які розвинулися на їх базі, широко застосовуються у біологічних дослідженнях, зокрема у фізіології та біохімії рослин.

2.1. ГРАВІМЕТРИЧНИЙ АНАЛІЗ

Гравіметричний аналіз – група аналітичних кількісних методів визначення складу речовин, що ґрунтуються на осадженні різними способами аналіту у вигляді нерозчинної речовини у стехіометричному співвідношенні.

Аналіз розроблений шведським хіміком Торбеном Улафом Бергманом. У основі лежить закон збереження маси речовини у хімічних перетвореннях.

Під час гравіметричного аналізу спочатку зважують на аналітичних терезах досліджувану речовину, переводять її у розчин, потім осаджують той складник речовини, кількість якого хочуть визначити, відокремлюють його від розчину, зневоднюють (сушать, прожарюють) і зважують твердий залишок.

Аналіз широко використовується для дослідження руд, сплавів, органічних речовин тощо.

Вимоги до методу:

- відтворюваність стехіометричного складу осаду;

- надзвичайно низька розчинність (щоб його можна було промити без відчутних втрат);

- мінімальна оклюзія: 1) захоплення кристалами під час їх росту інших за природою молекул із середовища, в якому відбувається їх зростання; 2) сорбція газу розплавленими або твердими речовинами, зазвичай металами), а отже, – мала поверхня адсорбції (крупні кристали);

- легка відділюваність; термічна стабільність для можливості висушення;

- стабільність, зокрема негігроскопічність і неокисдовність висушеного осаду.

Гравіметричний метод кількісного аналізу (масовий аналіз) базується на точному вимірюванні маси досліджуваної речовини або компонента суміші, який виділено в хімічно чистому вигляді або у вигляді хімічної сполуки точно відомого складу. Великою перевагою методу є найвища точність 0,01–0,005 %, але водночас великий недолік методу – довготривалість аналізу.

Усі численні гравіметричні визначення можна розділити на три великі групи:

- методи виділення;
- методи осадження;
- методи відгонки.

Метод виділення. У межах виділення речовину, яка визначається, кількісно виділяють у вільному стані з аналізованої суміші і зважують на аналітичних терезах. Так, наприклад, кількісно визначають золото і мідь у сплаві.

Наприклад, за умов розчинення певної наважки сплаву у царській горілці отримують розчин, який містить іони Au^{3+} і Cu^{2+} . Додаванням до отриманого розчину пероксиду водню, який відновлює іони золота до елементного золота і не впливає на іони Cu^{2+} , усе золото виділяють в елементному стані. Золото, яке виділилося, відфільтровують, промивають розведеним розчином хлористоводневої кислоти від сторонніх домішок, поміщають разом із фільтром у попередньо зважений фарфоровий тигель, висушують, прожарюють для видалення летких домішок і після охолодження зважують. За масою золота, яке виділилося, розраховують його вміст в аналізованому сплаві.

Якщо через промивні води і фільтр, який залишився після відділення золота, пропустити за певних умов постійний електричний струм, то на попередньо зваженому інертному відносно розчину платиновому катоді кількісно виділиться металічна мідь. За збільшенням маси катода розраховують масу міді, а тоді її вміст у сплаві.

Описаний метод визначення золота у сплаві називають гравіметричним, а міді – електрогравіметричним.

Методи осадження. У методах осадження визначуваний комплект кількісно осаджують хімічними способами у вигляді малорозчинної хімічної сполуки строго визначеного складу. Осад, який виділяється, промивають, висушують або прожарюють. Під час цього осад більшою частиною перетворюється в нову речовину точно відомого складу, яку і зважують на аналітичних терезах. В аналізі розрізняють: *осаджувану форму*, тобто форму, у вигляді якої осаджують визначувану речовину, і *вагову форму*, тобто форму, у вигляді якої визначувану речовину зважують. Вагова форма (гравіметрична) може мати ту саму формулу, що і форма осаджувана. Наприклад, під час визначення сульфат-іонів гравіметричним методом шляхом осадження їх іонами барію формула форми осаджуваної (осаду) і формула вагової форми за дотримання всіх необхідних умов аналізу однакові.

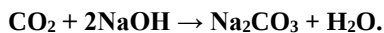
В окремих випадках гравіметричних визначень можливе отримання такої осаджуваної форми, яка може бути одночасно і ваговою формою, але може бути легко переведена в іншу гравіметричну форму. Наприклад, нікол (II) із розчину осаджують в аміачному середовищі спиртовим розчином диметилглюксиму у формі легкого кристалічного осаду:

Якщо осад диметилглюксимату ніколу (II) профільтрувати через скляний фільтр (№ 3, 4), висушити за температури 110–120 °С і зважити, то можна розрахувати вміст Ніколу у досліджуваному зразку. Але можливе одержання і гравіметричної форми NiO. За таких умов осад фільтрують через паперовий фільтр. Після його озолення диметилглюксимат ніколу прожарюють за доброго доступу повітря та високої температури. Недоліком є часткова сублімація ніколу диметилглюксимату за температури 250 °С.

Методи відгонки. У методах відгонки визначуваний компонент кількісно відганяють у вигляді леткої сполуки. Визначувану частину відганяють шляхом нагрівання аналізованої речовини або дією відповідних реагентів, яка супроводжується виділенням летких продуктів. Методи відгонки бувають прямі і непрямі.

Прямі методи відгонки. Визначуваний леткий компонент поглинають специфічним поглиначем і за збільшенням маси останнього розраховують масу визначуваного компонента.

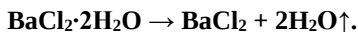
Прикладом прямого гравіметричного визначення леткої речовини є визначення CO₂ в карбонатних породах, яке базується на розкладанні карбонатів кислотами:



Зразок карбонату розкладають у спеціальних приладах, які дають змогу вловити CO₂, що виділяється. Вміст CO₂ розраховують за збільшенням маси трубки,

яка застосовується для поглинання CO_2 (вона містить натронне вапно $\text{CaO} + \text{NaOH}$).

Непрямі методи відгонки. У непрямих методах визначають масу залишку речовини після повного видалення визначуваної речовини. Різниця в масі до і після відгонки визначуваної речовини дає можливість розрахувати кількість визначуваного компонента. Схема цього визначення:



Непрямі способи гравіметричних визначень застосовують для визначення вологості матеріалів, кристалізаційної води в кристалогідратах, втрати маси під час прожарювання тощо.

Гравіметричні методи аналізу дають змогу з відносно високою точністю визначати в цьому зразку аналізованої речовини кількісний вміст окремих компонентів або (якщо дано розчин) концентрацію їх у розчині. Гравіметричний аналіз придатний для визначення багатьох металів (катионів) і неметалів (аніонів), складників сплавів, руд, силікатів, органічних сполук і под.

Найбільш істотною перевагою гравіметричного методу є висока точність аналізу. Звичайна похибка гравіметричного визначення становить 0,1–0,2 %. За аналізу проби складного складу погрішність зростає до декількох відсотків через недосконалість методів розділення і виділення аналізованого компонента. До переваг гравіметричного методу належить також відсутність будь-яких стандартизації або градувань зі стандартних зразків, необхідних майже в будь-якому іншому аналітичному методі. Для розрахунку результатів гравіметричного аналізу потрібне знання лише молярних мас і стехіометричних співвідношень.

Селективність гравіметричного аналізу невисока у зв'язку з відсутністю відповідних реагентів на більшість іонів. Одним із найбільш селективних є гравіметричне визначення нікелю у вигляді диметилглюксиму, але такі приклади поодинокі, і гравіметричні методи зазвичай вимагають попереднього хімічного поділу з метою виділення аналізованого компонента. Істотним недоліком гравіметричного методу є тривалість визначень. Це практично виключає застосування гравіметричного аналізу, наприклад, для поточного технологічного контролю виробництва і там, де швидкість виконання аналізу має вирішальне значення. Найчастіше гравіметричний метод застосовують для визначення основних компонентів проби, коли на виконання аналізу відводиться кілька годин чи десятків годин, для аналізу еталонів, що використовуються в інших методах, в арбітражному аналізі, для встановлення складу мінералів, різних речовин, включно з синтезованими, складу різних композицій тощо. Практичне застосування гравіметричного методу залишається дуже широким.

Під чутливістю методу розуміють мінімальну кількість компонента, що визначається, яка може бути знайдена певним методом в одиниці маси чи об'єму

речовини. Межею чутливості можна вважати такий вміст компонента, коли інтенсивність аналітичного сигналу у певну кількість разів (зазвичай не менше ніж удвічі) перевищує значення флуктації фону. Так, якщо флуктація фону під час визначення маси за допомогою звичайних аналітичних терезів складає 0,0001, то їх чутливість можна прийняти рівною 0,0002, проте є терези, чутливість яких на два порядки вища. Різні методи хімічного аналізу на порядки відрізняються за чутливістю. Наприклад, алюміній методом амперметричного титрування можна визначити, якщо його вміст перевищує 200 мг/л, емісійної спектроскопії – 0,2 мг/л, спектроскопії розчинів – 0,002 мг/л, активаційним – 0,00002 мг/л, тобто співвідношення чутливостей цих методів складає 1 : 10 : 1000 : 10000000.

Точність аналізу зазвичай визначається величиною відносної помилки, тобто відношенням абсолютної похибки до дійсного результату, яка подається у відсотках. Абсолютна похибка, розмірність якої відповідає розмірності визначуваної величини (г, мл, % тощо), є різницею між істинною величиною і середньою величиною виміру. Зрозуміло, що вона може мати позитивний і негативний знак.

За точністю більшість фізико-хімічних методів аналізу поступаються класичним, особливо гравіметричному. Часто, коли гравіметричними і об'ємними досягається точність, що визначається сотими і десятими частками відсотка, під час виконання аналізу інструментальними методами похибки визначень складають 5–10 %, а іноді і більше. Із цього можна зробити важливий для практики аналізу висновок: не варто удаватися до особливо чутливих методів, коли в цьому немає необхідності. Так, якщо потрібно визначити з точністю 10^{-1} – 10^{-2} % вміст основного компонента, який у речовині складає десятки відсотка, то немає необхідності користуватися високочутливими мас-спектроскопічними або радіоактиваційними методами аналізу. Цілком достатньо скористуватися ваговим або об'ємним методом, що забезпечують необхідну точність під час аналізу великих кількостей речовин, і до того ж не вимагають застосування складного обладнання.

Для оцінки точності методів кількісного аналізу передусім необхідно строго розрізняти дві сторони цього поняття: правильність і відтворюваність. Правильність характеризує відповідність результатів аналізу і дійсного (реального) вмісту компонента. Відтворюваність характеризує розкид окремих результатів відносно середнього результату або дійсної величини. Очевидно, що відтворюваність є дуже важливою характеристикою методу аналізу і техніки його виконання. Якщо немає хорошої відтворюваності, то неможливо говорити про правильність результатів (крім тих рідкісних випадків, коли позитивні і негативні відхилення взаємно повністю компенсуються). Отже, відтворюваність є необхідною, але недостатньою умовою точності аналізу (прикладі із стрільбою по мішені).

Зміщення понять правильності і відтворюваності – одна із найбільш поширених і грубих помилок аналітиків. Будь-який хімічний та інструментальний

аналіз є ланцюгом операції, і помилка може виникнути на різних етапах (приклад з об'ємним методом). Багато помилок можуть повторюватися систематично під час проведення повторних аналізів навіть без вини оператора. Тоді результати будуть добре відтворюваними, однак далекими від правильних. Так, під час титрування бури соляною кислотою за фенолфталеїном розрахунок на основі середнього арифметичного за умов відтворюваності 1 % дасть відхилення від наявного результату мінімум 10 %, оскільки неправильно вибраний індикатор.

Відтворюваність встановлюється шляхом математичної обробки результатів. Одним із таких методів є графічний за допомогою побудови кривих розподілення Гауса. Для цього виконують багато паралельних визначень, після чого відкладають на осі абсцис одержані результати у відносних відсотках до середнього результату, а по осі ординат – число дослідів, за яких одержані результати з певним відхиленням.

2.2. ТИТРИМЕТРИЧНИЙ АНАЛІЗ

МЕТОДИ КИСЛОТНО-ОСНОВНОГО ТИТРУВАННЯ (НЕЙТРАЛІЗАЦІЇ)

Методи кислотно-основного титрування уперше запропоновані в 1828 р. Ж. Гей-Люссаком, який розробив метод алкаліметрії, оснований на використанні реакції між кислотами і лугами. У загальному вигляді цю реакцію можна представити рівнянням:



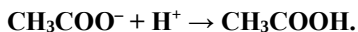
Залежно від титранту розрізняють ацидиметричне та алкаліметричне титрування. У методі ацидиметричного титрування (*acidum* – кислота) у якості титрантів застосовують 0,1 і 0,01 N розчини HCl і H₂SO₄. У методі алкаліметричного титрування (*alkalis* – луг) – 0,1 і 0,01 N розчини NaOH і Ba(OH)₂.

Ацидиметричне титрування застосовують для визначення сильних та слабких основ, основних солей, солей слабких кислот і органічних сполук, які мають основні властивості. Під час ацидиметричного титрування реакція середовища в момент еквівалентності (називана точкою еквівалентності) може бути нейтральною, кислою або лужною залежно від типу речовини, яка визначається. Під час титрування сильних основ розчинами кислот у момент еквівалентності утворюються вода і нейтральна сіль, розчин має нейтральну реакцію. Якщо титрується слабка основа, наприклад, NH₃, проходить реакція нейтралізації слабкої основи сильною кислотою; отримана сіль слабкої основи піддається гідролізові:



У момент еквівалентності розчин має кислу реакцію.

Під час титрування солей слабких кислот, наприклад, CH_3COONa , утворюється слабка кислота:



У момент еквівалентності реакція середовища слабкоокисла. Якщо сіль слабкої кислоти утворена поліпротонною кислотою, наприклад, Na_2CO_3 , то під час титрування спостерігається кілька точок еквівалентності.

Аналогічні явища відбуваються і під час алкаліметричного титрування, яке застосовують для визначення сильних і слабких кислот, кислих солей, солей слабких основ і органічних сполук, що мають кислі властивості (кислоти, феноли). Під час титрування сильних кислот розчинами лугів утворюється вода і нейтральна сіль; реакція середовища в точці еквівалентності нейтральна. Під час титрування слабких кислот, наприклад, оцтової, утворюється ацетат-іон, що піддається гідролізу, унаслідок чого реакція середовища в точці еквівалентності стає слабколужною. Кислі солі, наприклад, NaHSO_4 , під час титрування утворюють середні солі (Na_2SO_4) і воду, і точка еквівалентності знаходиться у нейтральному середовищі. Солі слабких основ під час титрування розчином NaOH утворюють слабку основу, що піддається гідролізу, і реакція середовища в точці еквівалентності стає слабколужною. Органічні (слабкі) кислоти також здатні титруватися розчином NaOH , причому аніон кислоти, що утворюється, вступає в реакцію гідролізу, і середовище стає лужним.

Визначення точки еквівалентності в кислотно-основному титруванні проводять різними способами: хімічними індикаторами і фізико-хімічними методами – зі зміною рН середовища (потенціометричним), електричної провідності розчину (кондуктометричним), зміною оптичних властивостей розчину (фотометричним і спектрофотометричним), зміною струму, що проходить через розчин (амперометричним) тощо.

Кислотно-основні індикатори. Індикатори – речовини, що змінюють свої будову і фізичні властивості за умови зміни властивостей середовища. Найчастіше за таких умов змінюється колір індикатору, іноді – люмінесценція. Індикатори кислотно-основного титрування змінюють будову і властивості під час зміни рН середовища, і їх називають кислотно-основними індикаторами. Розрізняють індикатори кислотного (Hind) і основного (Ind) типу. У розчинах індикатори можуть існувати в іонізованій і неіонізованій формах, які знаходяться в рівновазі, що залежить від рН середовища. Іонізована і неіонізована форми індикаторів мають різний колір. Зміна кольору обумовлюється перетвореннями хромофорних груп у молекулі індикатору. Наприклад, фенольні групи під впливом лужного середовища здатні переходити в хіноїдні, які надають молекулі індикатору червоний або малиновий колір внаслідок утворення системи спряжених зв'язків. За умови зміни концентрації іонів водню в розчині відбувається зрушення рівноваги,

кількість однієї з форм зменшується, іншої – зростає, і забарвлення розчину змінюється.

Відомо близько 200 кислотно-основних індикаторів, що належать до різних класів органічних сполук. Найбільше поширення мають індикатори групи трифенілметану та азосполук.

Трифенілметанові індикатори. Із цієї групи найчастіше застосовують фталейнові і сульфопталейнові індикатори. У фталейнових індикаторів лактонне кільце під впливом лужного середовища розривається і утворюється хромофорна хіноїдна група. Із безбарвної лактонної форми утворюється хіноїдна форма, яка має червоний або фіолетовий колір. До фталейнових індикаторів належить **фенолфталейн**, що змінює колір від безбарвного в кислому середовищі до червоно-фіолетового в лужному. **Тимолфталейн** – індикатор, за структурою аналогічний до фенолфталейну, містить два залишки тимолу. У лужному середовищі стає синім внаслідок утворення хіноїдної групи. Інтервал переходу від безбарвної форми до синьої знаходиться в межах рН від 9,0 до 10,5.

Сульфопталейнові індикатори містять сульфогрупи, що виконують роль ауксохромів і підсилюють колір індикатору. Зміна їх кольору також відбувається внаслідок утворення хіноїдної групи в лужному середовищі. Прикладом сульфопталейнових індикаторів є **феноловий червоний**, який у розчинах залежно від рН середовища існує в декількох формах. За умови $\text{pH} < 1,5$ індикатор існує у вигляді нейтральної протонованої форми червоного кольору. У межах $\text{pH} 3\text{--}6,4$ індикатор існує у вигляді іона жовтого кольору, за $\text{pH} > 8,2$ – у вигляді іона червоного кольору. **Кристалічний фіолетовий** – диметиламінна похідна трифенілметану у вигляді кристалів із бронзовим блиском. Залежно від рН середовища змінюється ступінь протонування атомів азоту у молекулі індикатору, яке викликає відповідну зміну його кольору.

Індикатори групи азосполук залежно від рН середовища здатні існувати в декількох формах, які мають різний колір. **Метилловий оранжевий** – натрієва сіль 4-диметиламіноазобензол 4'-сульфо кислоти. Являє собою оранжево-жовтий порошок, який утворює розчин такого самого кольору у лужному середовищі. У кислому середовищі індикатор змінює забарвлення від жовтого до червоного. Інтервал переходу кольору від червоного до жовтого знаходиться в межах змін рН середовища від 3,1 до 4,4. **Метилловий червоний** – порошок червоно-бурого кольору. У лужному середовищі знаходиться у вигляді жовтої азоформи, у кислому – переходить у червону хіноїдну форму. Перехід від червоного кольору до жовтого відбувається в інтервалі рН від 4,2 до 6,2.

Крім індивідуальних, часто для титрування застосовують змішані індикатори – суміші двох-трьох індикаторів і більше, що дають у розчинах чіткіші переходи забарвлення.

Титранти та стандарти кислотно-основного титрування. Як титранти у кислотно-основному титруванні застосовують розчини соляної і сірчаної кислот і гідроксид натрію. Розчини кислот готують 1 N, 0,5 N, 0,1 N концентрації. Розчин HCl готують виходячи з концентрованої соляної кислоти (37 %, $\rho = 1,19$). У практиці фармацевтичного аналізу також застосовуються 0,05 N, 0,02 N, 0,01 N і 0,005 N розчини HCl, які готують розведенням із 0,1 N розчину.

Стандартизацію розчинів HCl проводять зазвичай за точною наважкою тетраборату натрію $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, який розчиняють у воді і титрують розчином HCl (індикатор метиловий оранжевий). За отриманими даними розраховують титр, нормальність і поправочний коефіцієнт розчину кислоти. Крім тетраборату натрію, можна використовувати карбонат натрію.

Розчини сірчаної кислоти готують із концентрованої H_2SO_4 . Розраховану наважку або відміряний об'єм концентрованої сірчаної кислоти поміщають у мірчу колбу, наполовину заповнену водою, і доводять водою до 1 л. Точну концентрацію сірчаної кислоти встановлюють за тетраборатом натрію.

Розчини гідроксиду натрію готують 1 N, 0,5 N, 0,1 N, 0,05 N, 0,01 N концентрації. 0,1 N NaOH готують із твердого NaOH. На технічних терезах відважують наважку NaOH і розчиняють у п'ятикратній кількості води, розчин підігрівують і додають чотириразовий об'єм 0,5 N BaCl_2 (для осадження карбонатів). Після осадження карбонатів прозорий розчин декантують у мірчу колбу на 1 л, дозволять до мітки прокип'яченою дистильованою водою і перемішують. Розчин стандартизують за щавлевою кислотою (індикатор фенолфталеїн) або за 0,1 N HCl.

Як стандарти застосовують тетраборат натрію, карбонат натрію та щавлеву кислоту; за допомогою тетраборату та карбонату натрію встановлюють титр і нормальність розчинів кислот, щавлевої кислоти – розчинів гідроксиду натрію. Наважки стандартів беруть такі, щоб виходив розчин, який має концентрацію, близьку до концентрації титранту. Якщо є фіксанали, що містять 0,1 моль NaOH, HCl, $\frac{1}{2}\text{H}_2\text{SO}_4$, то титранти готують із них, не проводячи визначення титрів. Випускаються також фіксанали стандартів, які можна використовувати для визначення точної концентрації титранту.

МЕТОДИ ОКИСНО-ВІДНОВНОГО ТИТРУВАННЯ (РЕДОКСМЕТРІЯ)

Окисно-відновне титрування (редоксметрія) оснований на реакціях окислення / відновлення. Під час його проведення речовина, яка титрується, вступає в окисно-відновну реакцію з титрантом. Якщо титрант – окисник, титрування називають окисним, а коли титрант – відновник, – відновним. Окисно-відновних реакцій відомо багато (понад 90 000). Для кількісного аналізу підходять тільки деякі реакції, що: а) протікають до кінця; б) проходять швидко; в) утворюють продукти визначеного складу; г) дають змогу фіксувати точку еквівалентності; д) не вступають у побічні взаємодії; е) є необоротними.

Необхідною умовою застосування реакції є можливість визначення (індикації) точки еквівалентності, що залежить від величини ЕРС (різниці потенціалів реагуючих редокс-пар). ЕРС за умови хімічної індикації повинна бути не меншою за 0,4–0,5 В, за умови інструментальної – не меншою за 0,2 В. У протилежному разі реакція проходить або не до кінця, або під час титрування відсутній відповідний різкий стрибок потенціалу у зоні еквівалентності титрування. Індикація кінця титрування стає складною.

Титрантами в методах редоксметрії слугують розчини окисників і відновників. Залежно від умов вони можуть вступати в реакції, у яких бере участь різна кількість електронів. Тому часто титранти не мають постійного еквівалента. Наприклад, у кислому середовищі іон Mn_4^- приєднує 5 електронів і відновлюється до Mn_2^+ , у лужному – 3 електрони і відновлюється до Mn_2 , у нейтральному – 1 електрон і відновлюється до Mn_4^{2-} . Тому у кислому середовищі $E-KMnO_4 = 158,04/5 = 31,606$; у лужному – 2,68; у нейтральному – 158,04.

У методах редоксметрії частіше використовуються як титранти окисники через більшу стійкість їх розчинів (розчин $K_2Cr_2O_7$, наприклад, стійкий до 24 років). Розчини відновників менш стійкі (окиснення киснем повітря) і зберігаються нетривалий час.

В окисно-відновному титруванні існують можливості регулювання потенціалу редокс-пари титранту та речовини, яка визначається, для чого використовують зміни рН середовища, комплексоутворюючі добавки, збільшення температури тощо. Коло речовин, які можна визначати цим методом, широке завдяки великому набору титрантів і можливості регулювання процесу титрування.

Наразі розроблено понад 50 методів окисно-відновного титрування. Їх називають за типом застосовуваного титранту. Найширшого застосування набули такі види окисно-відновного титрування: перманганатометричне (титрант – розчин $KMnO_4$); йодиметричне (титранти – розчини I_2 і $Na_2S_2O_3$); броматометричне (титрант – розчин $KBrO_3$); дихроматометричне (титрант – розчин $K_2Cr_2O_7$) та ін.

Використовується кілька видів окисно-відновного титрування – пряме, зворотне і замісне. *Пряме титрування* проводять за $ЕРС > 0,4$ В, що забезпечує необхідну повноту і швидкість протікання реакції відновного титрування. *Зворотне титрування* використовується в окисно-відновних реакціях, які протікають повільно. За таких умов до суміші, що титрується, додають надлишок титранту 1 і витримують певний час (для повноти протікання реакції). Надалі надлишок титранту 1 титрують іншим титрантом 2. *Замісне титрування* проводять, визначаючи замісник – продукт, що виділяється в еквівалентній кількості у перебігу реакції речовини, яка визначається, з яким-небудь реактивом. Таким способом титрування аналізують речовини, які не вступають в окисно-відновні реакції.

Окисно-відновні індикатори. У методах окислення / відновлення для визначення точки еквівалентності застосовують інструментальні та індикаторні

способи. З інструментальних способів широке застосування знайшли потенціометричне та амперометричне титрування. В індикаторних способах використовують: а) окисно-відновні (редокс-) індикатори, які змінюють колір за умови зміни окисно-відновного потенціалу системи; б) специфічні індикатори, які змінюють свій колір із появою титранту або зникненням речовини, яка титрується.

Редокс-індикатори існують у двох формах – окисненій і відновленій, причому колір однієї форми відрізняється від іншої. Перехід індикатору з однієї форми в іншу і зміна його забарвлення відбувається за умови певного потенціалу переходу, що спостерігається під час рівності концентрацій окисленої і відновленої форм індикатору і за рівнянням Нернста–Петерса.

Інтервал переходу редокс-індикаторів дуже невеликий, на відміну від кислотно-основних індикаторів. Серед редокс-індикаторів розрізняють: а) оборотні редокс-індикатори, які оборотно змінюють свій колір зі зміною потенціалу системи; б) необоротні редокс-індикатори, що піддаються необоротному окисленню або відновленню, внаслідок чого колір індикатору змінюється необоротно; в) люмінесцентні індикатори, у розчинах яких за відповідного потенціалу з'являється люмінесценція. З оборотних редокс-індикаторів часто застосовують такі:

Дифеніламін. Під впливом окисників відбувається необоротне окислення дифеніламіну (віддача $2e^-$ двома молекулами індикатору) з утворенням безбарвного дифенілбензидину, далі – оборотне окислення з утворенням продуктів фіолетово-синього кольору – дихінондиаміну і його полімеру. Реакція оборотна у сильноокислому середовищі (рН 0).

Фенілантрапілова кислота – карбонільна похідна дифеніламіну. Механізм перетворень її аналогічний до описаного вище для дифеніламіну. У відновленій формі індикатор безбарвний, в окисненій – червоно-фіолетового кольору.

Метиленовий синій – NNN'N'-тетраметилтіоніну хлорид. Оптимальні переходи забарвлення спостерігаються за умови рН 3.

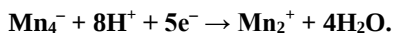
Під час проведення окисно-відновного титрування необхідно підбирати індикатор так, щоб потенціал переходу індикатору знаходився в межах стрибка потенціалу на кривій титрування. Багато індикаторів окисно-відновного титрування мають кислотні або основні властивості і можуть змінювати свою поведінку залежно від рН середовища. У таких випадках титрування ведуть, створивши необхідний рН (наприклад, дифеніламін застосовують у кислому середовищі).

Специфічні індикатори застосовують у низці методів окислення / відновлення. Найбільш часто застосовують крохмаль – індикатор на присутність вільного йоду. У його присутності крохмаль за кімнатної температури синіє. Поява синього забарвлення крохмалю обумовлюється адсорбцією йоду на амілозі, яка входить до складу крохмалю. За умови використання як титранту розчину $KMnO_4$ нема необхідності застосовувати індикатори, тому що за найменшого його

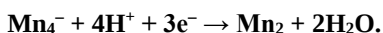
надлишку розчин набуває добре помітного рожевого кольору. Крім описаних, застосовують низку інших індикаторів.

Перманганатометричне титрування (перманганатометрія)

Перманганатометричне титрування проводять титрантом – розчином перманганату калію – найчастіше в кислому середовищі у присутності H_2SO_4 . За таких умов проходить напівреакція:



Рідше використовують відновлення перманганатів-іонів у нейтральному середовищі до MnO_2 (бурі осади) за напівреакцією:



Розчини KMnO_4 готують звичайно 0,1 N, наважку беруть трохи більше за розрахункову. KMnO_4 є сильним окисником і змінює свою концентрацію у присутності різних відновників – органічних домішок, аміаку. Тому приготувані розчини KMnO_4 фільтрують через скляні фільтри і витримують 7–10 днів у темному місці для того, щоб пройшли всі окисно-відновні процеси з домішками, які містяться у воді і потрапили в розчин із пилом. Тільки після цього концентрація розчину KMnO_4 стає постійною і його стандартизують за щавлевою кислотою.

Індикатором у перманганатометричному титруванні слугує сам титрант, за умови найменшого надлишку якого розчин забарвлюється у рожевий колір. Тому титрування розчином KMnO_4 проводять до появи рожевого забарвлення титриметричної суміші. Під час роботи з розчинами KMnO_4 (та інших окисників) використовують бюретки зі скляним краном.

Перманганатометрія застосовується для аналізу низки хімічних сполук і лікарських препаратів, що мають властивості відновників. Перманганатометричне титрування застосовують для аналізу легкоокислюваних органічних сполук. Карбонові кислоти – щавлева, винна, лимонна, яблучна – взаємодіють із KMnO_4 з відщепленням CO_2 . У біохімічному аналізі рослин перманганатометрія застосовується для визначення деяких відновників (зокрема редукуючих цукрів). Для визначення редукуючих цукрів застосовується замісне титрування.

Йодиметричне титрування (йодиметрія)

В основі йодиметричного титрування лежать реакції відновлення вільного йоду до йодид-іонів і окислення йодид-іонів у вільний йод. У водних розчинах I_2 знаходиться у вигляді комплексу I_3^- із йодид-іонами, тому напівреакції з його участю мають вигляд:



Цим методом можна визначати окисники і відновники. Йодиметричне титрування проводять у нейтральному середовищі, тому що в кислому середовищі

KI утворює кислоту HI, яка чутлива до впливу світла і виділяє вільний I_2 . У сильнонолужному середовищі I_2 взаємодіє з лугами, утворює гіпоїодиди.

Усі окисники, які мають більш високий потенціал, наприклад, $KMnO_4$, $K_2Cr_2O_7$, KIO_3 здатні окислювати йодиди до вільного йоду. Речовини, які мають більш низький потенціал, наприклад, $Na_2S_2O_3$, $CuCl_2$, $SnCl_2$, Na_2SO_3 , відновлюють йод до йодид-іона.

Наважку йоду беруть трохи більше від розрахункової з огляду на те, що продажний кристалічний йод може містити домішки, або його очищають сублімацією. Йод летучий, і під час відважування частина наважки може звітритися, тому всі процедури приготування розчину йоду проводять, використовуючи бюкси і, за можливістю, швидко. Нормальність приготованого розчину йоду встановлюють титруванням 20 мл його іншим титрантом – 0,1 N $Na_2S_2O_3$. Як індикатор використовують розчин крохмалю, синє забарвлення якого під час досягнення точки еквівалентності переходить у безбарвне. Індикатор методу йодиметрії – 1 % розчин розчинного крохмалю.

Йодиметричне титрування широко застосовується в хімічному аналізі. Із неорганічних речовин цим методом аналізують I_2 , $KMnO_4$, Na_3AsO_4 , Hg_2Cl_2 , $CuSO_4$. Йодиметрія застосовується також для аналізу багатьох органічних лікарських препаратів – формаліну, акрихіну, антипірину, анальгіну, коразолу, аскорбінової кислоти, пеніциліну тощо. Застосовують кілька варіантів методу. Пряме титрування розчином $Na_2S_2O_3$ використовують під час аналізу йоду і настойки йоду. Замісним титруванням визначають окисники, як-от $KMnO_4$, Na_3AsO_4 , $CuSO_4$. У цьому варіанті до розчину речовини попередньо додають розчин KI. Під час окислення останнього утворюється в еквівалентній кількості новий окисник I_2 (замісник), який титрують розчином $Na_2S_2O_3$.

Йодиметричне титрування часто використовують в аналізі органічних сполук для визначення функціональних груп. У біохімії рослин цей метод застосовують для визначення деяких цукрів, активності ферментів тощо.

2.3. ФОТОМЕТРИЧНИЙ МЕТОД

Метод фотометрії застосовується для визначення концентрації розчинів речовин за поглинанням променів у різних ділянках спектру від інфрачервоного до ультрафіолетового. Одним із найбільш простих методів фотометричного аналізу є колориметрія. Вона оснований на вимірюванні поглинання світла забарвленими розчинами у видимій частині спектру.

Розчини багатьох речовин, зокрема і пігментів рослин, мають характерне забарвлення, яке обумовлене вибіркоvim поглинанням світла іонами та молекулами. Інколи забарвлення проявляється вже після розчинення речовин у воді або іншому розчиннику. Однак найчастіше забарвлення викликають, додаючи до розчину реактив, який взаємодіє з речовиною, що потрібно визначити, і утворює

забарвлений розчин. Вимірюючи поглинання світла забарвленим розчином або порівнюючи отримане забарвлення з забарвленням розчину з відомою концентрацією, визначають вміст забарвленої речовини, яку аналізують, у розчині.

Залежність між інтенсивністю забарвлення розчину і вмістом в ньому забарвленої речовини описується законом Бугера–Ламберта–Бера і виражається рівнянням:

$$I = I_0 \times 10^{\varepsilon \times C \times l},$$

де:

I – інтенсивність потоку світла, яке пройшло через розчин;

I_0 – інтенсивність потоку світла, що падає на розчин;

ε – коефіцієнт поглинання світла – постійна величина, яка залежить від природи розчиненої речовини (молярний коефіцієнт поглинання);

C – молярна концентрація забарвленої речовини;

l – товщина шару розчину, який поглинає світло (у см);

Величину ε (молярний коефіцієнт поглинання світла) можна визначити, якщо провести вимірювання поглинання світла 1 М розчину речовини в кюветі з оптичним шляхом 1 см. Вимірювання проводиться за умови довжини хвилі, яка дорівнює максимуму поглинання.

Фізичний зміст закону Бугера–Ламберта–Бера полягає в тому, що розчини однієї і тієї самої забарвленої речовини за однакової її концентрації і товщини шару, і якщо зберігаються інші рівні умови, поглинають одну і ту саму частку світла, яке потрапляє на них. Тобто поглинання світла цими розчинами однакове.

Якщо провести логарифмування наведеного рівняння та змінити знаки на обернені, то воно набуває такого вигляду:

$$\lg\left(\frac{I_0}{I}\right) = \varepsilon \times C \times l.$$

Величина $\lg(I_0/I)$ є найважливішою характеристикою забарвленого розчину і називається **оптичною густиною розчину (D)**:

$$D = \lg\left(\frac{I_0}{I}\right) = \varepsilon \times C \times l.$$

Звідси випливає, що оптична густина прямо пропорційна до концентрації забарвленої речовини та товщини її шару.

Відношення інтенсивності монохроматичного потоку випромінювання, який пройшов через дослідний об'єкт, до інтенсивності початкового потоку випромінювання називають **прозорістю**, або **пропусканням (T)** розчину:

$$T = \frac{I}{I_0} = 10^{-\varepsilon \times C \times l}.$$

Між оптичною густиною D та пропусканням T існує таке відношення:

$$D = -\lg T,$$

або, якщо T виражають у відсотках:

$$D = \lg(I/T) \times 100 = 2 - \lg T.$$

Для визначення концентрації $C_{\text{досл}}$ забарвленого розчину потрібно провести вимірювання його оптичної густини $D_{\text{досл}}$ за допомогою фотоелектроколориметру або спектрофотометру. До того ж потрібно визначити оптичну густину ($D_{\text{см}}$) стандартного розчину з відомою концентрацією ($C_{\text{см}}$). Товщина шару розчинів в обох випадках повинна бути однаковою. Концентрацію дослідного розчину обчислюють за формулою:

$$C_{\text{досл}} = \frac{D_{\text{ст}} \times C_{\text{ст}}}{D_{\text{досл}}}.$$

Для визначення показників оптичної густини або пропускання використовують електричні прилади типу фотоелектроколориметрів (КФК-2, КФК-2МП, КФО та ін.) або спектрофотометрів (СФ-4А, СФ-26 та ін.).

2.4. ХРОМАТОГРАФІЯ

Метод хроматографічного аналізу запропонував російський вчений М. С. Цвет у 1903 році. Він екстрагував петролейним ефіром пігменти з зеленого листя і пропускав розчин через скляну трубку з карбонатом кальцію. Під час проходження розчину через сорбент окремі пігменти розділялися та утворювали ряд кілець, тобто хроматограму. У сучасних дослідженнях, зокрема і біологічних, хроматографія широко застосовується для розділення різних речовин (пігменти, цукри, білки, амінокислоти та ін.).

Хроматографічні методи класифікуються за загальними ознаками: за агрегатним станом середовища суміші компонентів, що розділяються; за механізмом процесу розділення; за формою (технікою) проведення хроматографічного процесу.

За агрегатним станом середовища розрізняють газову, рідинну та газорідинну хроматографію.

За механізмом процесу розділення сумішей виділяють адсорбційну, іонообмінну, осадову, розподільну, окисно-відновну та адсорбційно-комплексотворюючу хроматографію.

За технікою проведення розрізняють колоночну, капілярну та площинну (хроматографія в тонкому шарі, мембранна та хроматографія на папері).

Найчастіше використовується **розподільна хроматографія**, яка оснований на різному розподіленні речовин між двома рідинами, які не змішуються між собою. Під час проведення такої хроматографії носій (колонка, папір чи тонкий

шар) утримує лише одну з рідин, яка є **нерухомим розчинником**. Друга рідина відіграє роль **рухомого розчинника**, який рухається по носієві із невеликою швидкістю. Носіями в розподільній хроматографії слугують силікагель, кремнезем, оксид алюмінію, крохмаль, хроматографічний папір; як нерухомі розчинники використовують воду, етиловий спирт та деякі інші полярні рідини, а як рухомі розчинники – неполярні або малополярні рідини (пентанол, бутанол, ацетон та подібні до них).

Найважливішою характеристикою речовин є відношення концентрації їх у рухомому розчиннику до концентрації в нерухомому розчиннику (за досягнення стану рівноваги). Цей показник називається **коефіцієнтом розподілення**:

$$K = \frac{C_{\text{рух}}}{C_{\text{нерух}}}$$

Оскільки у компонентів суміші різні коефіцієнти розподілення, швидкість руху їх по носієві також різна. Найбільшу швидкість мають компоненти з більшим коефіцієнтом розподілення. Тому на хроматограмі вони пройдуть більшу відстань, ніж ті, що мають менший коефіцієнт розподілення.

Ще одним важливим показником розподілення речовин є **відношення шляху, пройденого речовиною, до шляху, який пройшов розчинник – Rf**. Для його визначення вимірюють відстань від лінії старту до центра плями речовини та від лінії старту до лінії фронту розчинника. Для кожної речовини ця величина є постійною і характеризує положення цієї речовини на хроматограмі.

У біологічних дослідженнях дуже часто використовується різновид розподільної хроматографії – **хроматографія на папері**. Носієм нерухомого розчинника в цьому разі є спеціально оброблений хроматографічний папір. Це очищений фільтрувальний папір з орієнтованими певним способом волокнами целюлози. Використовують **низхідну** хроматографію, коли розчинник рухається зверху вниз аркушем паперу, та **висхідну** (розчинник рухається знизу вгору) хроматографію.

Використання хроматографії дає змогу розділяти доволі складні суміші речовин і визначати окремо вміст кожної з них. Водночас слід враховувати, що якість розділення речовин залежить від багатьох факторів. Найголовнішими з них є концентрації речовин, що розділяються, та температура. До того ж на розділення впливають якість та структура паперу, насиченість хроматографічних камер парами розчинника.

Концентрація речовин. З огляду на визначення коефіцієнта розподілення можна зробити висновок, що адсорбція залежить від концентрації речовини в суміші. За умови низьких концентрацій речовин у розчині значення **K** високе і розділення іде якісно. За умови збільшення концентрації речовин значення коефіцієнта зменшується, а якщо концентрація речовини на одиницю поверхні сорбенту досягне граничних значень, тривкість зв'язку речовини з сорбентом зни-

жується, і досліджувана речовина «повзе» з потоком розчинника. Але слід враховувати, що за умови низьких концентрацій речовин, хоча якість розділення буде висока, їх може не вистачити для кількісного визначення. Тому визначення концентрації речовин для нанесення на хроматограму є дуже складним завданням. Потрібно обрати компромісну кількість речовини на одиницю поверхні хроматограми, яка забезпечила б якісне розділення та необхідну кількість для кількісного аналізу.

Температура. Адсорбція є процесом екзотермічним, зворотний процес – десорбція – іде з поглинанням тепла. Звідси випливає, що за умови зниження температури адсорбційна рівновага зсувається у бік адсорбції, а кількість адсорбованої речовини збільшується. За умови підвищення температури адсорбція речовин на носії зменшується, тому хроматографічне розділення речовин краще вести за пониженої температури. Оптимальною є температура 10–15 °С. Для цього хроматографічну камеру поміщують у кюветі із льодом. За цієї умови зони речовин будуть більш компактними, а їх границі більш чіткими.

Хроматографічний папір. На якість і швидкість розподілення впливає хроматографічний папір. Хроматографічний папір випускають декількох типів залежно від швидкості руху розчинника: «Швидкий», «Середній» та «Повільний». Для багатьох біологічних досліджень рекомендують використовувати папір марки «Швидкий». У деяких випадках (наприклад, розділення іонів металів у біологічних об'єктах) хроматографічний папір потрібно додатково очищувати з допомогою обробки певними реактивами і наступним промиванням. Для якісного розділення речовин розчинник треба пропускати вздовж волокон целюлози (зазвичай ці волокна розташовують паралельно до довгої сторони аркуша).

Насичення камери парами розчинника сильно впливає на розділення речовин. Якщо камера недостатньо насичена парами, розчинник швидко випаровується з поверхні хроматограми і рух його зупиняється (хроматограма висихає). Тому потрібно ретельно закривати камери під час проведення розділення речовин. Інколи, наприклад, під час розділення цукрів або амінокислот, хроматографічні камери спеціально насичують парами розчинника, наливаючи його на дно камери.

2.5. ГЕЛЬ-ЕЛЕКТРОФОРЕЗ

Під електрофорезом звичайно розуміють рух зарядженої частки у розчині під впливом електричного поля. Сила, яка викликає рух сферичної частки в однорідному електричному полі за відсутності солей, дорівнює опорові тертя, що ця частка повинна перебороти в рідині, тобто:

$$Q \times E = 6 \times r \times \eta \times v.$$

де Q – електричний заряд частки;

E – напруженість електричного поля;

r – радіус частки;

η – в'язкість середовища;

v – швидкість частки.

Під час електростатичної взаємодії частки із солями буфера швидкість її руху зменшується на деяку величину, яку можна обчислити, якщо відомо значення електрокінетичного потенціалу, густина оточуючого частку електричного подвійного шару і її заряд.

Рухливість частки визначається як відношення швидкості v до напруженості поля E :

$$u = \frac{v}{E} = \frac{Q}{6 \times \pi \times r \times \eta} \left(\frac{\text{см}^2}{\text{в} \times \text{сек}} \right).$$

Оскільки напруженість поля – це відношення щільності струму (а/см^2) до питомої електропровідності χ ($\text{ом}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$), швидкість v , з яким частка рухається під час вільного електрофорезу, можна описати виразом:

$$v = \frac{u \times J}{\chi} \left(\frac{\text{см}}{\text{сек}} \right).$$

На рухомість частки впливають також рН і іонна сила середовища (зазвичай середовищем слугує який-небудь буферний розчин). Отже, дійсна рухливість частки визначається зарядом іонів, що, зі свого боку, залежить від ступеня дисоціації слабкої кислоти, основи або амфотерної сполуки за обраного значення рН. У першому наближенні рухливість обернено пропорційна квадратному кореню з іонної сили.

За низької іонної сили буферних розчинів частки рухаються швидко і кількість виділюваного тепла незначна, тоді як за високої іонної сили частки рухаються повільніше і тепла виділяється більше (хоча зони поділу за таких умов виходять більш чіткими). Максимально припустима сила струму визначається кількістю тепла, що виділяється в гелі, тому що за умови підвищення температури рухливості іонів і вільна дифузія зростають.

Тобто рух часток під час електрофорезу залежить від цілої низки факторів: від розмірів, форми, концентрації, електричного заряду, ступеня гідратації і ступеня дисоціації самих часток, від в'язкості, рН, температури та іонної сили середовища, від напруженості електричного поля, тривалості електрофорезу і довжини шляху, пройденого часткою.

Співвідношення між електрофоретичною рухливістю, швидкістю пересування, напруженістю поля, величиною рН і іонною силою однакові для вільного електрофорезу і для електрофорезу у носії (зональний електрофорез). В останньому випадку на рухливість і чіткість розділення впливають також адсорбція, неоднорідність речовини носія і його іонообмінні властивості, електроосмос,

капілярний ефект, підвищення температури і розведення. Поліакриламідний гель має перевагу, що за умов використання його як носія вплив адсорбції і електроосмосу виключаються.

Електрофорез у гелі (від англ. «discontinuous» – переривчастий) є методом розділення, у якому використовується неоднорідна («переривчаста») поділяюча система з поліакриламідним гелем як носієм. На відміну від методу електрофорезу, розробленого Раймондом, де застосовується однорідна буферна система з постійним значенням рН, у диск-електрофорезі використовують пари буферів різного складу і з різними значеннями рН, а носій складається з окремих шарів гелю, які відрізняються один від одного за розмірами пор. Завдяки цьому поділювані речовини концентруються спочатку в дуже вузькій стартовій зоні, що має вирішальне значення для чіткого розділення суміші.

Висока розв’язувальна здатність диск-електрофорезу базується на двох фізичних явищах: *ефекті концентрування та ефекті молекулярного сита.*

Ефект концентрування. Його зміст полягає в тому, що за зміни концентрації різних іонів у кожній ділянці гелю у процесі електрофоретичного розділення сума відносних *c/u* для всіх компонентів залишається незмінною, внаслідок чого поділювана суміш концентрується вузькою смугою. Цей ефект часто називають також *«ефектом рухливої границі Кольрауша»* або просто *«ефектом Кольрауша»*.

Ефект молекулярного сита. Як відомо, гелі відрізняються від рідких середовищ більшою в’язкістю, і внаслідок цього – більш високим опором тертя. Цими властивостями і обумовлюється ефективність електрофорезу у крохмальному або поліакриламідному гелі: частки, що рухаються в гелях, випробують залежно від свого розміру різний опір тертя, а отже, розділяються не тільки за своїми зарядами, але і «просіваються» залежно від розміру і форми молекул. Отже, метод електрофорезу у крохмальному гелі, розроблений у 1955 р. Смітисом, характеризується, порівняно з електрофорезом на папері, значно кращою розв’язувальною здатністю, тому що він сполучає два принципи поділу – за електрофоретичною рухливістю і на основі ефекту молекулярного сита. На тих самих принципах ґрунтується і розділення речовин у поліакриламідному гелі. Слід зазначити, що ефект молекулярного сита не у всіх видах гелів відіграє однакову роль; наприклад, в агаровому гелі він не виявляється. Переваги поліакриламідного гелю, порівняно з крохмальним, полягають у такому: ефективність електрофорезу у крохмальному гелі більшою мірою залежить від якості самого гелю, який одержують із природних продуктів і властивості якого через це не завжди однакові. Поліакриламідний гель позбавлений цього недоліку, тому що це синтетичний полімер; його одержують за постійних умов із речовин певної хімічної будови і високого ступеня чистоти, і тому результати легко відтворювані. До того ж є можливість широко варіювати щільність сітки гелю (розміри пор): під час

зміни концентрації від 2 до 30 % (у перерахуванні на акриламід) гель залишається прозорим.

Ефект молекулярного сита в поліакриламідному гелі особливо помітно виявляється під час розділення білків, які несуть однаковий заряд, але розрізняються за розмірами, тобто таких білків, що не розділяються за допомогою вільного електрофорезу. Завдяки цьому ефекту швидкість пересування того самого білка під час електрофорезу в гелі і під час вільного електрофорезу може бути зовсім різною. Відомі білки з високою електрофоретичною рухливістю, які у гелі переміщуються повільніше, ніж білки з меншою рухливістю, оскільки через свої великі розміри вони випробують більш сильний гальмуючий вплив сітки гелю.

Переваги і недоліки неоднорідних буферних систем. У 1957 р. Полин звернув увагу на те, що розв'язувальна здатність електрофорезу у крохмальному гелі можна підвищити за допомогою неоднорідних буферних систем. Як рідину для електродів він застосовував боратний буфер, а крохмальний гель готував на нітратному буфері. Переміщення прикордонного шару, яке спостерігалось за таких умов, до анода він відносив за рахунок переривчастого градієнта напруги. Для електрофорезу у поліакриламідному гелі неоднорідна *трис*-боратна система також виявилася найкращою.

Проте принципове питання про перевагу неоднорідних буферних систем перед однорідними остаточно ще не вирішене. Раймонд відмовляється від неоднорідних систем, оскільки, на його думку, чіткі стартові зони можна одержати і у однорідних системах. До того ж Хьертен та ін. указують, що деякі біологічні речовини і структури (наприклад, рибосоми) стійкі лише у певних буферних розчинах у вузьких межах рН. Природно, що в таких випадках неоднорідні буферні системи із рН, значення яких сильно відрізняються, неприйнятні. Але щоб розділення було гарним, стартова зона повинна бути і у цих випадках досить чіткою, тобто поділювану суміш необхідно сконцентрувати. Для цього її розчиняють у буферному розчині, який має меншу іонну силу, а отже, – меншу електропровідність, ніж у електродного буфера і буфера, на якому приготований гель, або ж піддають діалізові. За такого способу концентрування приходиться під час переміщення речовин у поділяючому гелі користуватися слабким струмом (щоб уникнути теплової конвекції, обумовленої відносно високим опором); оптимальна сила струму підбирається експериментально.

З усього сказаного повинно бути ясно, що необхідно завжди враховувати вплив рН на речовини, які підлягають розділенню за допомогою диск-електрофорезу.

Процеси, що протікають під час гель-електрофорезу

Концентрування досліджуваних розчинів. Під час електрофорезу зазвичай користуються маленькими колонками поліакриламідного гелю, які склада-

ються з трьох частин: 1) крупнопористий стартовий, або антиконвекційний, гель, що містить розчин речовин, які підлягають розділенню; від його застосування наразі більшість дослідників відмовилась; 2) крупнопористий концентруючий гель, у якому відбувається концентрування речовин, які підлягають розділенню; 3) дрібнопористий поділяючий гель, у якому ці речовини розділяються. В установку для диск-електрофорезу входять також електроди, судини для електродів, заповнені буферним розчином, і джерело живлення. Іони, що рухаються під час електрофорезу в одному напрямку з речовинами, які фракціонують, і зумовлюючим ефектом Кольрауша, можна розбити на два класи – ведучі іони і замикаючі іони. На початку розділення ведучі іони знаходяться в усіх трьох частинах стовпчика, а замикаючі – тільки в електродному буфері. Значення рН для стартового і концентруючого гелів вибирають так, щоб ефективні рухливості ведучих (L) і замикаючих (F) іонів і білків (P) розташовувалися в такому порядку:

$$u\alpha L > u\alpha P > u\alpha F.$$

Якщо через усю систему гелю пропустити струм, то ведучі іони внаслідок їх більшої рухливості обженуть білки і замикаючі іони, залишаючи за собою зону з меншою електропровідністю. Але оскільки питома електропровідність обернено пропорційна до напруженості електричного поля, остання буде в цій зоні більш високою; завдяки цьому рух білків і замикаючих іонів прискориться, і вони будуть рухатися за ведучими іонами з тією самою швидкістю. У системі встановлюється регульована рівновага, тому між ведучими і замикаючими іонами утворюється рухлива границя, яка розділяє області з більш високою і більш низькою напруженістю. Ць відбувається через те, що рухливість білків трохи нижча за рухливість ведучих іонів, але вища за рухливість замикаючих іонів, білки концентруються у вузькій зоні, переднім фронтом якої слугує рухлива границя Кольрауша. Окремі білки послідовно розташовуються на колонці між ведучими і замикаючими іонами відповідності до своєї рухливості, утворюючи диски товщиною кілька мікронів.

Поділ речовин. Коли білкова зона, «утиснута» між ведучими і замикаючими іонами, досягає границі між гелями, вона зустрічається з подвійним порушенням безперервності, тому що поділяючий гель характеризується іншими значеннями рН і іншими розмірами пор. «Нове» значення рН у поділяючому гелі підбирають із таким розрахунком, щоб ступінь дисоціації замикаючих іонів (а виходить, і їх рухливість) збільшився в багато разів. Внаслідок цього замикаючі іони здобувають рухливість, близьку до рухливості ведучих іонів, тому вони переганяють білки і рухаються перед ними безпосередньо за ведучими іонами. Водночас відбувається зміна електричного поля, і тепер уже білки рухаються в області з постійною напруженістю поля і з постійним значенням рН; тут вони піддаються зональному електрофорезу і розділяються (за відповідного вибору

величини пор гелю) за своїми розмірами, формою та електричним зарядом молекул. У білків із різною молекулярною масою (тобто з різними константами дифузії), навіть якщо вони мають однакову вільну рухливість, швидкість руху теж виявляється різною, чим досягається їх розділення. Отже, сполучення ефекту концентрування та ефекту молекулярного сита під час диск-електрофорезу обумовлює в кінцевому підсумку високу розв'язувальну здатність цього методу.

ПИТАННЯ ДЛЯ ПЕРЕВІРКИ ЗНАНЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Наведіть характеристику гравіметричного методу аналізу.
2. Як класифікується гравіметричний аналіз? Охарактеризуйте кожен із цих підметодів.
3. Наведіть переваги та недоліки гравіметричного аналізу.
4. Дайте характеристику титриметричних методів. Для чого вони використовуються? На які групи поділяються?
5. Охарактеризуйте методи кислотно-основного титрування. Які реакції використовуються у цих методах?
6. Які титранти використовуються у кислотно-основному титруванні? Які концентрації цих речовин найбільш уживані?
7. Наведіть характеристику індикаторів, які використовуються у кислотно-основному титруванні. На чому основана зміна їх кольору?
8. Як здійснюється стандартизація розчинів титрантів?
9. На чому ґрунтуються методи окисно-відновного титрування?
10. Дайте характеристику окисно-відновних індикаторів.
11. Дайте характеристику перманганатометричного титрування. Для аналізу яких речовин воно застосовується у біохімії рослин?
12. Дайте характеристику йодометричного титрування. Для аналізу яких речовин воно застосовується у біохімії рослин?
13. Для чого застосовується фотометричний метод аналізу?
14. Наведіть характеристику колориметричного методу визначення концентрації речовин.
15. У чому полягає фізичний зміст закону Бугера–Ламберта–Бера?
16. Що таке коефіцієнт пропускання та оптична густина розчинів? Які співвідношення між цими величинами?
17. Що таке калібрувальний графік? Для чого він будується?
18. Із якою метою проводиться хроматографія?
19. Які основні типи хроматографічного розділення речовин ви знаєте?
20. Що таке коефіцієнт рухомості (K) та R_f ? Що вони характеризують?
21. Які умови впливають на якість хроматографічного розділення речовин?

22. Які речовини називають свідками? Для чого вони наносяться на хроматограми?

23. Що таке проявлення хроматограм? Які речовини називаються проявниками?

24. Який процес називають електрофорезом? Для чого він може бути використаний?

25. Від чого залежить рухомість речовин під час електрофорезу?

26. Що таке диск-електрофорез? Які переваги і недоліки цього методу?

27. На які етапи поділяється процес диск-електрофорезу?

28. Які буферні системи використовуються у диск-електрофорезі? Чим вони розрізняються?

29. У чому полягає сутність стадії концентрування?

30. Як проводиться розділення речовин? Що таке «молекулярне сито»?

3. ПРАВИЛА РОБОТИ НА ДЕЯКИХ АНАЛІТИЧНИХ ПРИЛАДАХ

3.1. ПРАВИЛА ЗВАЖУВАННЯ НА АНАЛІТИЧНИХ ТЕРЕЗАХ

Усі виміри в хімічному аналізі проводяться за допомогою аналітичних приладів і мірчого посуду. Правильність і відтворюваність аналітичних приладів і вимірників істотно впливає на адекватність результатів хімічного аналізу дійсним даним.

Основним аналітичним приладом є лабораторні технічні і лабораторні аналітичні терези. Лабораторні технічні терези призначені для виміру маси тіл і випускаються чотирьох класів точності. Розрізняють терези з рівноплечим коромислом і двома чашками й одноплечі – з одною чашкою і протизагою-квадрантом. На рівноплечих терезах вантаж на одній чашці врівноважується гирями, які приміщують на другу чашку до зрівноважування. На одноплечих терезах вантаж, покладений на чашку, компенсують зняттям із плеча відповідної кількості вантажів, які знаходилися на ньому. Це здійснюється напівавтоматично за допомогою спеціального дискового пристрою. Лабораторні технічні терези використовують для зважування наважок, які не потребують високої точності.

Лабораторні аналітичні терези мають, порівняно з технічними, підвищену чутливість і точність. Існує кілька типів аналітичних терезів за розмірами граничного навантаження і точності: великовантажні (до 1 000 г; точність 1 мг), аналітичні (до 100–200 г; 0,1 мг), напівмікроаналітичні (до 50–100 г; 0,01 мг), мікроаналітичні (до 20–30 г; 0,001 мг), ультрамікроаналітичні (до 0,01 г; 0,00001 мг).

За конструкцією розрізняють кілька типів аналітичних терезів: рівноплечі, які мають дві чашки (для вантажу і для гир), механічне накладення частини гир і демпферні (заспокійливі) пристрої; одночашкові, що працюють за принципом квадранта (проти ваги) і обладнані механічним пристроєм для врівноваження вантажу і проти ваги, і торсійні терези, призначені для зважування малих наважок (до 1 000 мг) і працюють за принципом балансування пружини.

Найчастіше в лабораторіях використовують терези аналітичні демпферні електричні (ВЛР-200, АДВ-200, ВЛА-200), за допомогою яких можна швидко і точно відважити необхідну кількість речовини. Вони зручні в роботі і є безрейтерними (рейтер – пересувна дротова накладка на коромислі терезів, яка має певну масу; у старих марках терезів використовувалася для їх балансування).

Масу вантажу на терезах визначають трьома прийомами: масу у грамах – грамовою аналітичною гиркою, яка накладається на чашку терезів; десятих і сотих часток грама – дисковим набірним пристроєм та кільцями балансира; тисячних і десятитисячних часток грама – за положенням мікрошкали, розрахованої на 10 мг, яка має 100 поділок, і прикріпленої до стрілки терезів, відносно нульової

насічки на матовому екрані. У неробочому стані, під час накладання і зняття гир і вантажу, коромисло терезів піднімається і фіксується на спеціальних підставках за допомогою аретира. Це необхідно для того, щоб не зношувалися і не ушкоджувалися призми коромисла і чашок, від яких залежать чутливість і точність терезів.

Аналітичні терези характеризуються правильністю, чутливістю та погрішністю. Правильність показань терезів – відповідність показань терезів дійсній масі тіла – перевіряють або зважуючи вантаж із відомою масою, або міняючи місцями вантаж і гирі (масою 1/10 від граничного навантаження терезів) у збалансованих терезів. Правильність терезів забезпечується рівністю довжини пліч коромисла і рівністю мас обох пліч, тому правильність рівноплечих двочашкових терезів легко перевірити, помінявши місцями урівноважені вантаж і гирі. За нерівності пліч балансування терезів порушиться. Якщо терези дають неправильні показання, їх балансують. Погрішність, або відтворюваність, показань терезів визначають, зважуючи той самий вантаж кілька разів. Отримані результати обробляють прийомом математичної статистики. Чутливість терезів характеризується масою вантажу, що викликає відхилення стрілки на 1 поділку шкали. У загальному випадку чутливість терезів підвищується за умови збільшення довжини пліч і зменшується під час зростання навантаження і відстані між центром обертання коромисла і центром його маси.

Для зрівноважування вантажів на терезах застосовують набори гир. Гирі виготовляються п'яти класів точності. Гирі 1-го і 2-го класів точності призначені для зважувань вищої і високої точності, 3-го класу – для технічних аналізів підвищеної точності і зважування дорогоцінних металів, 4-го класу – для зважування медикаментів і технічних аналізів, 5-го класу – торгові і господарські гирі. У практиці хімічного аналізу зазвичай використовують гирі 2-го класу точності.

Під час роботи з терезами необхідно дотримуватися певних правил: *не дозволяється зважувати вантажі масою більш 200 г; температура предметів і речовин повинна бути кімнатною; речовини поміщають у спеціальну тару (бюкси, годинникові скла, тиглі) і кладуть на ліву чашку терезів, а гирки – на праву; гирки і предмети, які зважуються, вносять через бічні стінки футляра, ставлять і знімають із чашок тільки за умови закритого аретира; нульову точку терезів перевіряють до і після кожного зважування; предмети і гирки, щоб уникнути перекосу чашок, розміщують на їх середині.* Порядок зважування такий:

1. На ліву чашку аналітичних терезів помістити тару і зважити її, як описано вище.
2. До отриманої маси додати масу речовини, яка зважується.
3. Виставити отриману масу на праву чашку терезів (грамові гирі) і за допомогою барабанів – сотні і десятки міліграмів.

4. У тару насипати речовину, яка зважується, і перевірити її масу, відкривши аретир.

5. Якщо маса недостатня, то досипати речовину, що зважується, у тару і знову зважити. Повторювати прийом до одержання необхідної маси.

6. Якщо маса надлишкова, то необхідно відібрати деяку кількість речовини, що зважується, і знову визначити її масу.

Увага! Всі операції з установки гирок, досипання або відбору речовин, зняття її установки тари на чашку проводяться тільки за умови закритого аретису.

Терези необхідно утримувати в чистоті, оберігати від різких ударів, поштовхів і струсів. Під час зважування вантаж спочатку врівноважують гирями, а потім кільцями. Міліграми і десяті частки міліграма визначають за шкалою стрілки терезів. Закінчивши зважування, на терезах закривають аретир, записують результат, потім знімають із чашок гирки і вантаж, піднімають кільця, протирають чашки і закривають дверцята шафи терезів.

3.2. ПРАВИЛА РОБОТИ З ФОТОЕЛЕКТРОКОЛОРИМЕТРОМ КФК-2

Фотоелектроколориметр КФК-2 (колориметр фотоелектричний концентраційний) належить до однопроменевих приладів, призначених для вимірювання оптичної густини та пропускання світла за умови фіксованих довжин хвиль у

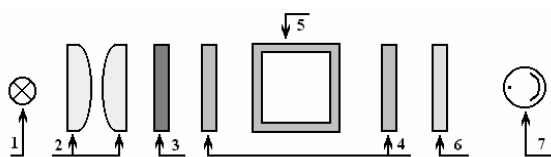


Рис. 1. Спрощена оптична схема однопроменевого фотоелектроколориметра:

- 1 – джерело світла; 2 – конденсор; 3 – світлофільтр;
4 – захисні скельця; 5 – кювета; 6 – матове скло;
7 – фотоелемент

межах від 315 до 980 нм. Монохроматичні світлові потоки створюються за допомогою набору світлофільтрів із визначеними максимумами пропускання світла. Спрощена оптична схема приладу наведена на рис. 1.

Як джерело світлового потоку у приладі використовується галогенна лампа (1). Промені світла проходять через конденсор (2) для створення паралельного потоку, один з одинадцяти світлофільтрів (3), за допомогою яких створюється монохроматичний потік світла, і захисне скло (4). Далі промені світла потрапляють у кювету з дослідним або контрольним розчином (5), де відбувається поглинання світла, і потрапляють на фотоелемент (7), електричний сигнал із якого через електронну схему індикуються мікроамперметром. Шкала мікроамперметра має поділки для відліку пропускання світла у відсотках (від 5 до 100 %, верхня шкала) та оптичної густини (від 0 до 1,3, нижня шкала).

Для проведення вимірів потрібно мати дослідний розчин, контрольний розчин (чистий розчинник або суміш реактивів без дослідної речовини) та стандартний розчин для калібрування приладу. Порядок роботи із приладом такий:

1. Вмикають прилад у мережу струму за допомогою кнопки «Мережа» і дають йому прогрітись протягом 30 хвилин (під час прогрівання приладу кришка кюветної камери повинна бути відкрита).

2. Установлюють у світловий потік світлофільтр із необхідною довжиною хвилі та чутливістю схеми (Увага! Значення довжин хвиль від 315 до 540 нм на



Рис. 2. Зовнішній вигляд фотоелектроколориметра КФК-2

шкалі мають чорний колір, а від 590 до 980 нм – червоний. На шкалі чутливості ліва частина позначена цифрами 1, 2 та 3 чорного кольору, а права частина має ті самі значення червоного кольору. Якщо використовуються короткохвильові світлофільтри з чорним маркуванням, то на шкалі чутливості перемикач також установлюється на одне зі значень чорного кольору, і навпаки). Значення чутливості спочатку встановлюють у положення «1».

3. Перемикач кювет переводять у положення «1».

4. У тримач кювет вставляють кювети з контрольним розчином (так, щоб потік світла проходив через неї в положенні «1» перемикача) і дослідним розчином.

5. За контрольним розчином настроюють прилад на 100 % пропускання або 0 оптичної густини за допомогою ручок настройки з правого боку панелі. Якщо стрілка вимірювача не доходить до поділки «100» (шкала пропускання) або «0» (шкала оптичної густини), перемикач чутливості переводять в положення «2» або «3».

6. Переводять перемикач кювет у положення «2» і проводять відлік пропускання або оптичної густини.

7. Дослідний розчин у другій кюветі замінюють стандартним і повторюють вимірювання оптичної густини або пропускання світла.

3.3. ПРАВИЛА РОБОТИ НА СПЕКТРОФОТОМЕТРІ СФ-26

Спектрофотометр СФ-26 призначений для вимірювання коефіцієнта пропускання дослідного зразка (T) або його оптичної густини (D) в ультрафіолетовій та видимій частинах спектру. Світловий потік створюється лампою розжарювання у видимій частині спектру або дейтерієвою лампою в ультрафіолетовій частині. Монохроматичний світловий потік створюється з допомогою тригранної призми, яка розкладає біле світло на спектр. Введення певних променів у

кюветну камеру здійснюється поворотом призми та регулюванням ширини щілини, через яку проходить світло (чим менша щілина, тим точніше виділяється монохроматична частина світла). У монохроматичний потік випромінювання почергово вводяться контрольний та дослідний зразки.



Рис. 3. Спектрофотометр СФ-26

Послідовність роботи на спектрофотометрі така:

1. Установити у робоче положення фотоелемент та джерело світла, які відповідають обраному спектральному діапазону вимірювання.
 2. Закрити фотоелемент (ручка шторки у положенні «Закр.»).
 3. Увімкнути тумблер «Мережа», після чого повинні засвітитися лампа «Мережа» та одна з ламп «Д» (дейтерієва) або «Н» (розжарювання) відповідно до обраного джерела світла.
 4. Прогріти прилад протягом 1 години.
 5. Установити ручку «Компенсація» в положення «0».
 6. Установити потрібну довжину хвилі з допомогою барабану, який знаходиться біля тумблера «Мережа», у сторону збільшення довжини хвилі. Якщо за таких умов шкала повернеться на більший кут, ніж потрібно, то барабан повертається назад на декілька поділок і знову підводиться до потрібного значення.
 7. Установити ручку «Чутливість» у положення «1» (робоче положення).
 8. Перевірити початкові показання індикатору і, якщо потрібно, відрегулювати темновий струм (стрілка гальванометра повинна знаходитися на відмітці «0» пропускання або « ∞ » поглинання світла). Регулювання здійснюється із закритою шторкою фотоелемента (ручка у положенні «Закр.») за допомогою ручки.
 9. Установити у тримач кювет, розташований у кюветній камері, кювети з контрольним та дослідними розчинами.
 10. У світловий потік ввести контрольну кювету за допомогою ручки.
 11. За допомогою ручки «Щілина» підвести стрілку гальванометра на «0» поглинання або «100» пропускання.
 12. Ввести у світловий потік дослідну кювету і провести відлік оптичної густини або пропускання світла розчину на індикаторі.
- Увага!** Під час прогріву приладу, зміни кювет, налаштування довжини хвилі та темного «0» перемикач шторки фотоелементів повинен знаходитися у положенні «Закр.», а під час вимірів – у положенні «Відкр.».

3.4. ПРАВИЛА РОБОТИ НА СПЕКТРОФОТОМЕТРІ GRANUM 722.



Рис. 4. Спектрофотометр GRANUM 722

Спектрофотометр моделі 722 складається з шести частин.

1. **Джерело світла:** вольфрамова галогенна лампа, яка випромінює світло в діапазоні довжини хвиль 330–1 000 нм.

2. **Монохроматор:** виділяє випромінювання необхідної довжини хвилі та прибирає зайві хвилі.

3. **Кюветна камера:** для розміщення кювет зі стандартними та дослідними розчинами.

1. **Детектор:** перетворює світло, що пройшло через дослідний розчин, на електричний струм.

2. **Мікропроцесор:** перетворює електричний сигнал у цифрову форму.

3. **Дисплей:** відображає отримані дані в одиницях поглинання, пропускання або концентрації.



Рис. 5. Блок-схема спектрофотометра GRANUM 722

Світло від лампи фокусується на вхідній щілині та потрапляє у монохроматор, де призма розкладає його у спектр. Світло обраної довжини хвилі фокусується на вихідну щілину монохроматора

коліміруючим дзеркалом. Далі через один із фільтрів, які дають змогу прибрати паразитне випромінювання другого порядку, промінь проходить через кюветну камеру та потрапляє на детектор – кремнієвий фотодіод. Електричний сигнал, який генерується ним, обробляється мікропроцесором, і результат відображається на рідкокристалічному дисплеї у цифровій формі.

Органи управління та контролю. Основні органи управління та контролю спектрофотометра моделі 722 показано на рис. 6. Мережевий вимикач розташований на задній стінці приладу.

1. **Кюветне відділення.** У кюветотримач встановлюються кювети з калібрувальними та дослідними розчинами.

2. **Ручка установки довжини хвилі** використовується для установки потрібної довжини хвилі.

3. Індикатор включення приладу (ON/OFF).

4. **Рідкокристалічний дисплей** відображає результати вимірів у одиницях поглинання або пропускання, значення концентрації та фактора.

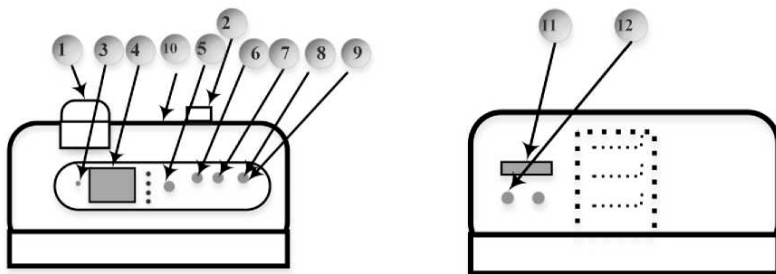


Рис. 6. Основні органи управління та контролю приладу

5. **Чотири червоні світлодіоди статусу** справа від цифрового індикатора вказують, який із режимів (вимір оптичної густини, коефіцієнта пропускання, значення фактора або концентрації) активний у поточний момент.

6. **Кнопка вибору режимів роботи** дає змогу вибрати режим виміру оптичної густини або коефіцієнта пропускання, установки значення концентрації або фактора.

7. **Кнопка «100»** використовується для установки 0 од. оптичної густини або 100 % пропускання під час калібрування. Прилад необхідно знову калібрувати після кожної зміни довжини хвилі.

8. **Кнопка «0»** призначена для установки «0» приладу в режимі пропускання. Установку «0» проводять після кожної зміни довжини хвилі.

9. **Кнопка «PRINT»** призначена для передачі результатів на принтер або комп'ютер через RS-232 порт.

10. **Кнопка «КОНЦЕНТРАЦИЯ / ФАКТОР»** використовується у режимі «Концентрація» для установки на дисплеї значення концентрації або відомого фактора.

11. **Вікно для зчитування ДОВЖИНИ ХВИЛІ** відображає встановлену довжину хвилі. Ціна найменшої поділки 2 нм.

12. **Роз'єм RS-232 C інтерфейсу** розташований на задній стінці приладу.

13. **Аналоговий вихід** – роз'єм із двома гніздами на задній стінці приладу.

Робота із приладом

Визначення оптичної густини та коефіцієнта пропускання

1. Підключити прилад до мережі. Увімкнути прилад та прогріти не менше 15 хв.

2. Обертанням ручки вибору довжини хвилі встановити необхідну. Установку довжини хвилі необхідно виконувати підводкою з боку коротких довжин хвиль до більш довгих. Якщо під час установки значення довжини хвилі пропущене, необхідно знову повернутися на 20–30 нм до більш коротких та повторно підвести до необхідного значення.

3. Установити прилад у режим пропускання за допомогою кнопки **«MODE»**. Поставити у кюветну камеру непрозору кювету (чорний кубик), закрити кришку кюветної камери та натиснути кнопку **«0»**. На дисплеї повинно з'явитися значення **0,00±0,01**. Повторно натиснути кнопку **«0»**, якщо значення відрізняється від вказаного. Забрати непрозору кювету.

4. За допомогою кнопки **«MODE»** вибрати режим поглинання (**A**, од. опт. густини або пропускання (**T**, %).

5. Заповнити кювету водою або розчином для холостої проби, згідно з обраною методикою.

6. Помістити кювету в кюветний відсік та натиснути кнопку **«100»**. На дисплеї повинно висвітлитися значення **0,00±0,01** (режим виміру оптичної густини).

7. Помістити у кюветний відсік кювету з досліджуванним розчином. Зчитати з дисплея результат в одиницях оптичної густини або процентах коефіцієнта пропускання (відповідно до обраного режиму).

8. Витягти кювету з кюветотримача.

9. Провести подальші виміри відповідно до **8, 9**.

10. За отриманими результатами вимірів провести обчислення згідно з обраною методикою.

Визначення концентрації

Використання режиму «C/Стандарт»

1. Установити прилад у режим пропускання за допомогою кнопки **«MODE»**. Поставити у кюветний відсік непрозору кювету (чорний кубик), закрити кришку кюветного відсіку та натиснути кнопку **«0»**. На дисплеї повинно з'явитися значення **0,00±0,01**. Повторно натиснути кнопку **«0»**, якщо значення відрізняється від вказаного. Прибрати непрозору кювету.

2. Натискаючи кнопку **«MODE»** установити режим оптичної густини (по-винен засвітитися червоний світлодіод навпроти **«A»**).

3. Помістити кювету з холостою пробой в кюветотримач і закрити кришку кюветного відсіку.

4. Натиснути кнопку **«100»** (100 % T/0 A). На дисплеї повинно з'явитися **0,00±0,01**.

5. Прибрати холосту пробу з кюветного відсіку.

6. Поставити кювету зі стандартним розчином.

7. Натискаючи кнопку **«MODE»**, вибрати режим виміру концентрації (по-винен засвітитися червоний світлодіод навпроти **«C»**).

8. Використовуючи кнопки **«INC»** та **«DEC»**, установити на дисплеї значення концентрації стандарту та натиснути на кнопку **«ENT»**.

9. Витягти кювету зі стандартним розчином.

10. Вставити кювету з досліджуванним розчином, закрити кришку кюветного відсіку та зчитати з дисплея результат в одиницях концентрації.

Використання режиму «С/Фактор»

1. Установити прилад у режим пропускання за допомогою кнопки **«MODE»**. Уставити в кюветний відсік непрозору кювету, закрити кришку кюветного відсіку та натиснути кнопку **«0»**. На дисплеї повинно з'явитися значення **0,00±0,01**. Повторно натиснути кнопку **«0»**, якщо значення відрізняється від вказаного. Прибрати непрозору кювету.

2. Натискаючи кнопку **«MODE»**, установити режим оптичної густини (повинен засвітитися червоний світлодіод навпроти **«A»**).

3. Помістити кювету з холостою пробою у кюветотримач, закрити кришку кюветного відсіку.

4. Натиснути кнопку **«100»** (100 % T/0 A). На дисплеї повинно з'явитися **0,00±0,01**.

5. Прибрати холосту пробу з кюветного відсіку.

6. Поставити кювету зі стандартним розчином.

7. Натискаючи кнопку, вибрати режим фактора (повинен засвітитися червоний світлодіод навпроти **«F»**).

8. Використовуючи кнопки **«INC»** та **«DEC»**, установити на дисплеї значення фактора (0–1 999) та натиснути на кнопку **«ENT»**.

9. Поставити кювету з досліджуванним розчином, закрити кришку кюветного відсіку та зчитати з дисплея результат у одиницях концентрації.

ПИТАННЯ ДЛЯ ПЕРЕВІРКИ ЗНАТЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Які типи лабораторних приладів для зважування ви знаєте?

2. Чим різняться між собою технічні та аналітичні терези? Для яких цілей використовується кожен із типів?

3. Наведіть правила зважування на аналітичних терезах.

4. Наведіть порядок зважування на аналітичних терезах.

5. Дайте характеристику призначення та принципу роботи фотоколориметра КФК-2.

6. Наведіть порядок роботи з фотоелектроколориметром КФК-2.

7. Із якою метою використовується спектрофотометр СФ-26? Як у цьому приладі відбувається виділення променів із певною довжиною хвилі?

8. Наведіть порядок роботи зі спектрофотометром СФ-26.

9. Наведіть характеристику та особливості роботи спектрофотометра GRANUM 722.

10. Опишіть порядок роботи зі спектрофотометром під час вимірювання оптичної густини.

11. Як застосовується режим С/Фактор? У яких випадках він потрібний?

4. ХАРАКТЕРИСТИКА ДЕЯКИХ КЛАСІВ ОРГАНІЧНИХ СПОЛУК РОСЛИН

4.1. БІЛКОВІ РЕЧОВИНИ

У рослинах білкові речовини містяться зазвичай у невеликій кількості, але грають у них величезну роль, складаючи основну масу протоплазми. Білки в рослинному організмі виконують різноманітні функції, найважливішими з яких є структурна, каталітична, рецепторна. Елементарний склад білків включає вуглець, водень, кисень в азот і майже завжди сірку, деякі з них містять також фосфор. Елементарний склад білкових речовин коливається незначно. Молекулярна маса білкових речовин коливається від декількох тисяч до декількох мільйонів. Велика кількість білка міститься в насінні деяких рослин, особливо бобових і олійних культур, наприклад, гороху, квасолі, соняшника. Із цього насіння порівняно легко можна виділити препарати білків для вивчення їх хімічного складу і будови.

Хімічна будова білків

За умови кип'ятіння з міцними кислотами, лугами, а також під дією ферментів білкові речовини розпадаються на більш прості сполуки, утворюючи суміш α -амінокислот. Подібне розщеплення білка називається *гідролізом*. Більшість α -амінокислот є похідними жирних кислот, у яких у α -вуглецевого атома один атом водню замінений аміною групою.

Необхідно підкреслити, що білки, які складаються з залишків α -амінокислот, містять певну кількість амінних і карбоксильних груп, і тому належать до амфотерних електролітів. Наразі описано близько 300 амінокислот, знайдених у природі. Однак тільки 20 амінокислот входять до складу білків (протеїногенні амінокислоти, табл. 3 додатків).

Потрібно зазначити, що рослини і мікроорганізми відрізняються надзвичайною розмаїтістю амінокислот, які не зустрічаються у складі білків, але містяться у клітинах і тканинах у вільному стані (**вільні амінокислоти**).

Класифікація білків

Усі білки розділяють на дві великі групи: *протеїни* (інакше прості білки), до складу яких входять лише залишки амінокислот, і *протеїди* (або складні білки) – сполуки простого білка (протеїну) з якою-небудь речовиною небілкової природи. Протеїни і протеїди підрозділяються на низку підгруп.

Протеїни

Альбуміни. Білки, що розчиняються у воді. Із водних розчинів альбуміни добре осаджуються за умови насичення розчинів солями (наприклад, сульфатом амонію). Під час кип'ятіння – випадають у вигляді згустків денатурованого

білка. Представниками альбумінів рослинного походження є *лейкозин*, який міститься в зародку пшеничного зерна, або *легуменін* із насіння гороху. Невелика кількість альбумінів знаходиться також у зелених частинах рослин.

Глобуліни. Нерозчинні у воді, але розчиняються у водних розчинах солей. Найчастіше як розчинник для екстракції глобулінів із різних об'єктів користуються 10 % розчином хлориду натрію. Для виділення глобулінів із сольового розчину його або розбавляють великою кількістю води, або діалізують у мішечку з напівпроникної плівки. Глобуліни складають більшу частину білка насіння, особливо у бобових рослин і олійних культур (*легуменін* із насіння гороху, *фазеолін* – квасолі, *едестин* – коноплі та ін.).

Проламіни. Ця група білків характерна винятково для насіння злаків і відрізняється найкращою розчинністю в 60–80 % етанолі. Назва «проламіни» запропонована внаслідок утворення під час їх гідролізу значної кількості амінокислоти проліну та аміачного азоту. Під час гідролізу проламінів, крім проліну та аміаку, утворюється багато глютамінової кислоти. Лізину вони не містять або містять його в доволі незначних кількостях. Проламіни знайдені у насінні усіх досліджених злаків. Відомі такі проламіни: *гладин* у насінні пшениці і жита, *гордгин* у насінні ячменю, *зеїн* у насінні кукурудзи, *кафірин* у насінні сорго, *авенін* у насінні вівса.

Глютеліни містяться у насінні злаків, а також у зелених частинах рослин. Розчинні тільки в розчинах лугів (0,2 %). Із вивчених глютелінів можна назвати такі: *глютенін* із насіння пшениці, *оризенін* із насіння рису.

Фосфопротеїни. Невелика група простих білків, характерною рисою яких є наявність у їх складі фосфорної кислоти, зв'язаної складноефірним зв'язком з оксигрупою серину і треоніну.

Гістони. Лужні білки. Вони містять приблизно 20–30 % лужних амінокислот (аргініну і лізину). Гістони, виділені з рослинної тканини, можуть бути розділені на п'ять фракцій: H1, H2a, H2b, H3 і H4. Ці білки відіграють важливу роль в утворенні хроматину.

Протеїди

Протеїди, або складні білки, є сполуками білка з речовиною небілкової природи, що називають простетичною групою. Залежно від хімічної природи простетичної групи розрізняють: ліпопротеїди, хромопротеїди, глікопротеїди і нуклеопротеїди.

У *ліпопротеїдах* роль простетичної групи відіграють різні жироподібні речовини – ліпіди. Ліпопротеїди містяться у великій кількості у складі пластид рослинної клітини (наприклад, хлоропластів), а також у протоплазмі.

Типовими представниками групи *хромопротеїдів* у рослин є цитохроми. У них білок зв'язаний із простетичною групою гемінової природи, належить до складних азотистих сполук, які включають залізо.

У *глікопротеїдах* роль простетичної групи відіграє вуглевод, ковалентно зв'язаний із залишками аспарагіну, треоніну, серину, оксидіну або оксипроліну молекули білка. Глікопротеїди містяться у тваринах, рослинах і мікроорганізмах. Прикладом глікопротеїда може слугувати запасний білок насіння квасолі – *віцілін*. До його складу входять маноза і N-ацетилглюкозамін, зв'язані N-глікозидним зв'язком із залишками аспарагіну. Деякі ферменти, наприклад, пероксидаза і глюкозооксидаза, належать до глікопротеїдів. У насінні та інших частинах деяких рослин знаходяться глікопротеїди, які викликають аглютинацію еритроцитів. Ці білки одержали назву *фітогеммаглютининів* або *лектинів*. Лектини мають також здатність аглютинувати ракові клітини, специфічно зв'язувати й осаджувати полісахариди і глікопротеїди, стимулювати мітози у деяких типів клітин. Фізіологічна роль лектинів у рослинах нез'ясована. Очевидно, лектини відіграють важливу роль у процесі «впізнання» бульбичковими бактеріями рослини-хазяїна, на коренях якого вони утворюють бульбочки. Під час нагрівання лектини руйнуються. До глікопротеїдів належать отруйні білки рослин, наприклад, *рицин* із насіння рицини (*Ricinus communis*) і *абрин* із насіння *Abrus precatorius*. Отруйність цих білків обумовлена тим, що вони необоротно інактивують рибосоми.

Особливо важливою групою складних білків є *нуклеопроетейди*, які відіграють першорядну роль у життєдіяльності організму, зокрема в явищах спадковості, і містяться в особливо великій кількості у клітинних ядрах. У нуклеопроетейдах білки зв'язані з *нуклеїновою кислотою*.

Виділення білків і встановлення їх однорідності

Виділення білків із якого-небудь рослинного матеріалу (насіння, листя, плодів і под.) полягає в екстрагуванні їх тим чи іншим розчинником після подрібнення цього матеріалу. Як розчинники застосовуються вода, сольові розчини, водно-спиртові розчини, слабкі кислоти і луги. Причому *слабкі розчини кислот і лугів здатні розчиняти усі фракції протеїнів, солі – альбуміни і глобуліни, а вода – тільки альбуміни*. Отриманий розчин білка потім обробляється тим чи іншим способом – нагрівається, насичується солями і діалізується, насичується спиртом або ацетоном, нейтралізується. Під час цього з розчину виділяється відповідна фракція білків, яка відокремлюється і висушується. Ці методи, розроблені ще наприкінці XIX сторіччя в основному завдяки працям Г. Ритгаузена, Ф. Гофмейстера та особливо Т. Б. Осборна, є до останнього часу загальноприйнятими. Однак в останні роки стало очевидно, що ці методи виділення білків недосконалі. Установлено, що у більшості випадків їх застосування спостерігається часткова денатурація білків, тому вони були удосконалені. Насамперед для якісного виділення білка необхідна *підтримка якомога більш низької температури на всіх етапах одержання препарату білка*. Установлено, що найкращою є температура, близька до температури замерзання розчинника, застосовуваного

для екстрагування білків. Не менш важлива умова – *підтримка рН на рівні, близькому до нейтральної реакції або ж до ізоелектричної точки цього білка.*

Під час сушіння препаратів білків найкращі результати дає так зване ліофільне сушіння, під час якого вода видаляється у глибокому вакуумі із замороженого стану. За допомогою ліофільного сушіння можуть бути виділені в неденатурованому стані препарати найбільш нестійких білків і ферментів.

Для дослідження однорідності білкових препаратів і виділення окремих білкових фракцій застосовуються різні методи, найбільш важливі з яких ґрунтуються на застосуванні ультрацентрифугування, електрофорезу, хроматографії. Особливо широке застосування одержав метод електрофорезу, розроблений А. Тизеліусом. Сутність електрофорезу полягає в розділенні речовин, які знаходяться в розчині, в електричному полі на основі розходжень їх електричних зарядів. Отже, під час електрофорезу розділяються білки, які розрізняються своїми електричними зарядами. Електрофоретичне дослідження білка роблять зазвичай за умови декількох значень рН. За останні роки широкого застосування одержав електрофорез розчинів білків і пептидів на різних носіях – фільтрувальному паперові, целюлозному або крохмальному порошку, поліакриламідному гелі. Ці методи дають змогу аналізувати надзвичайно малі кількості білків.

Доволі ефективним методом розділення білків, зокрема виділення очищених препаратів ферментів, виявилася хроматографія на колонках із фосфату кальцію, гідроксилапатиту, різних іонообмінних смол і похідних целюлоз. Особливо хороші результати дає *афінна хроматографія* на колонках, заповнених носієм, що строго вибірково адсорбує певний білок. За останні роки широкого застосування в біохімії одержав різновид хроматографії, оснований на принципі молекулярних сил (*гель-фільтрація*). Під час використання цього методу хроматографічна колонка заповнюється пористими гранулами сильно гідратованого вуглеводного полімеру, найчастіше сефадексу. Під час фільтрування через такий стовпчик суміші низькомолекулярних і високомолекулярних білків невеликі білкові молекули, проникаючи через пори усередину гранул сефадексу, будуть протікати по стовпчику повільніше, ніж білки, молекули яких не затримуються у порах гранул, і тому швидше витікати зі стовпчика. Білки витікають зі стовпчика зі швидкістю, обернено пропорційною до молекулярної маси.

Для білків специфічні деякі реакції, сукупність яких використовується для їх розпізнавання. Такою є здатність білків згортатися під час кип'ятіння розчинів і випадати у вигляді згустків. Надзвичайно характерною властивістю білків є осадження їх із розчинів під впливом різних так званих білкових **осаджувачів**: розчинів таніну, ацетату свинцю, вольфрамату натрію, гідроксиду міді, трихлор-оцтової кислоти. Осаджувачі широко застосовуються в лабораторіях для очищення від білка екстрактів, одержуваних із рослинного матеріалу.

Крім цих реакцій, білкам властиві реакції фарбування, що обумовлюються наявністю у білковій молекулі визначених хімічних угруповань. Такі, наприклад, **ксантопротеїнова, біуретова, нінгідрінова, мілонова** реакції, реакція **Адамкевича**.

ПИТАННЯ ДЛЯ ПЕРЕВІРКИ ЗНАТЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Наведіть характеристику білків. Яке значення ці речовини мають у життєдіяльності рослин?
2. Дайте характеристику хімічної будови білків. Які речовини є мономерами білкових молекул?
3. Дайте характеристику амінокислот. Запишіть формули амінокислот, які входять до складу білків.
4. Що таке вільні амінокислоти?
5. На які групи поділяються білки?
6. Дайте характеристику протеїнів.
7. Наведіть характеристику протеїдів.
8. Як проводиться виділення білків із рослин?
9. Як можна розділити суміші білків?
10. Які якісні реакції на білок використовуються? Дайте їх характеристику.

4.2. НУКЛЕЙНОВІ КИСЛОТИ

Нуклеїнові кислоти є одним із найголовніших класів органічних сполук живих організмів. Головні функції нуклеїнових кислот полягають у збереженні та передачі генетичної інформації. Невідомі живі істоти, де б ці процеси відбувалися без участі нуклеїнових кислот. Вирішальним для цього є сполучення таких властивостей: ***по-перше***, можливість утворення гігантських стійких лінійних полімерів; ***по-друге***, здатність до збирання на матриці такого полімеру його «***негативної копії***», яка, зі свого боку, може слугувати матрицею для синтезу точної копії вихідного полімеру.

Сучасними дослідженнями встановлено розподілення функцій збереження та передачі генетичної інформації між різними класами нуклеїнових кислот. У більшості живих організмів спадкова інформація зберігається у найбільш консервативній за структурою та властивостями дволанцюговій дезоксирибонуклеїновій кислоті (ДНК). У процесах передачі генетичної інформації для забезпечення процесів життєдіяльності, які безпосередньо не пов'язані з відтворенням генетичної нуклеїнової кислоти, використовуються більш лабільні та менш консервативні за структурою рибонуклеїнові кислоти. Усі вони поділяються на декілька видів за функціями, які виконують. Частина молекул рибонуклеїнових кислот є копіями ділянок генетичної нуклеїнової кислоти, які переносяться до

систем синтезу білка. Це так звані *месенджер-РНК* (інформаційні РНК, матричні РНК, мРНК). Крім мРНК, існує велика кількість *транспортних РНК* (тРНК), функції яких разом із низкою ферментів полягають у виборі та підготовці для включення до поліпептиду саме тих амінокислот, які відповідають черговому кодовому сполученню нуклеотидів мРНК. Рибонуклеїнові кислоти беруть також участь в утворенні та функціонуванні рибосом, на яких відбувається синтез білка (*рибосомальні РНК*, рРНК). Вони забезпечують точну збірку одного з найскладніших надмолекулярних утворень, яким є рибосома.

У препаратах, що виділені за допомогою м'яких методів, які не пошкоджують структуру ДНК, для простих ДНК-вірусів довжина молекули становить близько 500 нм , а у найскладніших вірусів, бактерій та в мітохондріях і пластидах – $0,5 \cdot 10^5$ – $2 \cdot 10^6 \text{ нм}$, тобто приблизно $0,05$ – 2 мм , що відповідає молекулярній масі 10^8 – $4 \cdot 10^9$ *дальтонів*. У еукаріотів імовірні значення довжини ДНК сягають *сантиметрів* і відповідають молекулярній масі 10^{10} – 10^{11} *дальтонів*. Довжина ниток РНК найчастіше варіює у межах 40 – $4 \cdot 10^4 \text{ нм}$, а молекулярна маса – $25 \cdot 10^3$ – $2 \cdot 10^6$ *дальтонів*. Більші молекули РНК зустрічаються рідко. Верхня межа молекулярної маси їх складає 10 – $14 \cdot 10^6$ *дальтонів*.

Молекули нуклеїнових кислот складаються з нуклеотидів, з'єднаних послідовно ковалентними зв'язками. У ДНК ланцюжки нуклеотидів з'єднані один з одним попарно водневими зв'язками. Зі свого боку, нуклеотиди складаються з пуринової або піримідинової основи, рибози або дезоксирибози та ортофосфornoї кислоти (рис. 7). Зв'язок між пентозою та піримідиною основою утворюється завдяки 1' атомом вуглецю цукру та 3(1) атомом азоту основи. У випадку пуринової основи в утворенні зв'язку приймає участь 9-й атом азоту основи. Напрямок зв'язку у 1'-атому пентози відповідає її β -конфігурації. Ортофосфорна кислота зв'язана з 5'-атомом пентози.

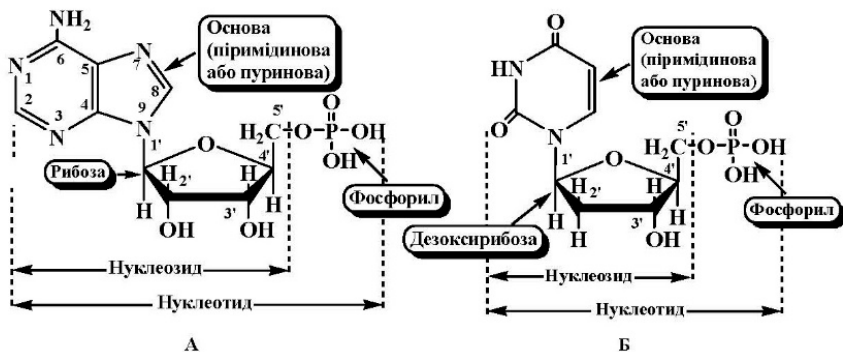


Рис. 7. Структура нуклеотидів

До складу нуклеїнових кислот входять переважно п'ять основ. Із деяким округленням молекулярна маса пуринових нуклеотидів складає 350 для АМФ та 360 для ГМФ, а піримідинових – 330 для УМФ та ЦМФ і 340 для ТМФ. Із пуринових основ аденін та гуанін входять до складу і РНК, і ДНК. Загальною є також одна з піримідинових основ – цитозин. Інші піримідинові основи є специфічними. Так, урацил входить тільки до РНК, а тимін до ДНК. Винятком є ДНК деяких вірусів (наприклад, фага сіної палички), яка містить урацил. До складу нуклеїнових кислот усі основи входять у кетонній формі, перехід у енольну форму за звичайних умов – явище дуже рідкісне, і якщо відбувається, то може порушитися спарювання основ (рис. 8).

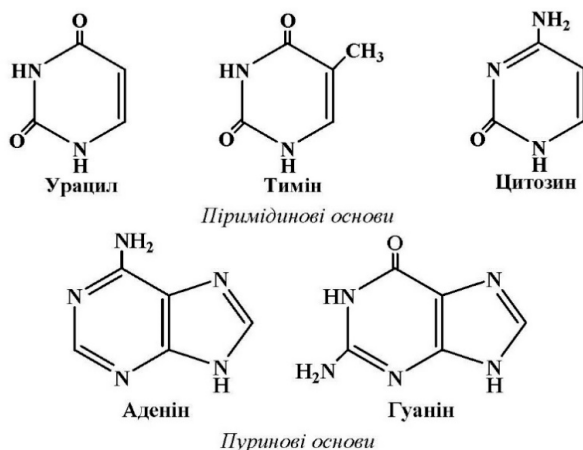


Рис. 8. Мажорні азотисті основи

Пентоза у РНК завжди представлена рибозою, а у ДНК – дезоксирибозою. Вони є D-ізомерами і знаходяться у циклічній (фуранозній) формі. Відмінності у пентозах є, вірогідно, головним фактором, який визначає відмінності властивостей РНК та ДНК.

Сполуку пуринової або піримідинової основи з рибозою або дезоксирибозою називають відповідно *рибонуклеозидом* або *дезоксирибонуклеозидом*, а сполука останніх із залишком ортофосфорної кислоти утворює *нуклеотид* (*рибонуклеотид* або *дезоксирибонуклеотид*). Крім найбільш розповсюджених основ, у нуклеїнових кислотах міститься велика кількість їх похідних у кількостях, які вимірюються десятими частками або одиницями відсотків (*мінорні основи*).

Виключно важливе значення мають закономірності вмісту окремих основ у ДНК. Ці закономірності були встановлені **Чаргаффом** у 1949 р. і стали ключем для розкриття вторинної структури ДНК. Аналіз складу великої кількості зразків очищеної ДНК показав, що:

- 1) молярна доля пуринів дорівнює молярній частці піримідинів;
- 2) кількість 6-кетогруп дорівнює кількості 6-аміногруп;
- 3) молярна маса A дорівнює молярній масі T , а $G - Ц$.

В усіх нуклеїнових кислотах нуклеотиди зв'язані 3',5'-фосфодиестерними містками. Для зручності описання умовно вважають початковим кінець ДНК з 5'-фосфорилом або 5'-ОН групою, а кінець із 3'-ОН групою або з 3'-фосфорилом – термінальним. Та або інша послідовність нуклеотидів, зв'язаних 3',5'-фосфодиестерними містками, точно визначена для кожної природної нуклеїнової кислоти і складає її первинну структуру. Більшість РНК та окремі ДНК складаються з одного полінуклеотидного ланцюжка. Більшість молекул ДНК складаються з двох полінуклеотидних ланцюжків, з'єднаних один з одним водневими зв'язками по всій довжині.

В основі взаємодії ланцюгів лежать особливості розташування функціональних груп пуринових та піримідинових основ, які допускають утворення системи водневих зв'язків тільки між деякими з них. Одним з партнерів у парі завжди є пуринова основа, іншим – піримідинова. Орієнтація основ на площині також не є довільною – 6-кето- та 6-аміногрупи завжди направлені в один бік. За дотримання всіх цих умов аденін завжди сполучається з тиміном, а гуанін – тільки з цитозином. Перша пара стабілізована двома водневими зв'язками, а друга трьома. Довжина зв'язків близька до 0,3 нм. Здатність до вибіркової взаємодії аденіну з тиміном, а гуаніну з цитозином називають **комплементарністю**, а відповідні основи називають **комплементарними**. Зв'язки основ із залишками пентози утворюють кут **74–79 °**. Закономірності взаємодії основ, що входять до складу дволанцюгової молекули ДНК, установлені **Уотсоном та Кріком** у 1953 р., на сучасному етапі не викликають сумнівів. Установлено, що взаємодія полінуклеотидних ланцюгів здійснюється завдяки утворенню водневих зв'язків між комплементарними основами. Послідовність основ у ланцюгах така, що всі вони або переважна їх більшість беруть участь в утворенні водневих зв'язків, тобто не тільки окремі основи, але і їх послідовність у ланцюгах є комплементарною. Це явище є однією з вирішальних умов стабільності молекул ДНК (рис. 9). У подвійному ланцюгу молекули ДНК пари основ розташовані біля осі молекули, а пентозофосфатні ланцюжки – назовні. Напрямок ланцюгів протилежний, що часто позначається терміном **антипаралельність**. Площини основ перпендикулярні до осі молекули ДНК, тоді як площини молекул дезоксирибози розташовані під певним гострим кутом до осі. До того ж кожен із ланцюгів молекули ДНК згорнутий у спіраль. Спіральний хід кожного з ланцюгів значною мірою обумовлений тим, що кінці фосфодиестерних містків зв'язані з атомами дезоксирибози, що знаходяться на різній відстані від основи. Кількісні характеристики біспіральної молекули ДНК такі: кожен виток спіралі містить **10 нуклеотидів**, проєкція

витка на вісь молекули складає **3,46 нм**, трансляційна відстань на кожний нуклеотид складає **0,34 нм**; діаметр молекули близький до **2 нм**; поперечник великої борозни дорівнює приблизно **1,7 нм**, а малої – **1,1 нм**.

Значну участь у стабілізації молекул ДНК відіграють і так звані вандервальсові сили (наприклад, диполь-дипольні). Характерною особливістю цих сил є те, що вони діють на досить незначних відстанях, тобто вони ефективні лише в небагатьох випадках точної відповідності конфігурації та розташування окремих груп у взаємодіючих молекулах.

Уявлення про строгу лінійність дволанцюгової ДНК в останні роки змінилося. З'ясувалося, що за певної послідовності основ ДНК може утворювати симетричні відгалуження, складки, так звані **шпильки**. Необхідна для цього послідовність нуклеотидів називається **паліндромом**. Послідовність основ в одному з ланцюгів паліндрома співпадає з послідовністю основ комплементарного ланцюга, якщо її читати у протилежному напрямку. Розмір паліндрома може варіювати у широких межах.

Одноланцюгові РНК практично всіх типів за умови фізіологічних значень іонної сили, рН, температури також містять значну кількість великих біспіральних областей, які утворюються завдяки комплементарним ділянкам у полінуклеотидному ланцюзі. Зі свого боку, це приводить до утворення складних складчастих, подібних до петель, структур. Значна кількість та величина біспіральних ділянок значною мірою визначає жорсткість третинної структури РНК. З іншого боку, наявність неспіралізованих ділянок робить усі одноланцюгові РНК більш гнучкими за структурою, ніж ДНК, що, вірогідно, необхідно для виконання низки специфічних функцій. Найменш спіралізованою за звичайних умов є **мессенджер-РНК**.

Характерними властивостями нуклеїнових кислот є денатурація та ренатурація. **Денатурація нуклеїнових кислот** – це процес порушення водневих та вандервальсових зв'язків між окремими основами та полінуклеотидними ланцюгами загалом. Денатурація нуклеїнових кислот може бути викликана цілою низкою факторів: *нагріванням, значними змінами рН, крайнім зниженням іонної сили*. Денатурація нуклеїнових кислот реєструється за допомогою цілої низки методів: *змін оптичної густини, оптичної активності та низки інших властивостей*, які безпосередньо пов'язані із спіралізацією. Процес, обернений до



Рис. 9. b-форма вторинної структури ДНК

денатурації, – **ренатурація**. Ренатурації можна досягти поступовим охолодженням розчину денатурованої ДНК та витримкою його за температури, на 20–25 °C меншої, ніж температура плавлення. Навпаки, швидке охолодження до низьких температур (0–20 °C) фіксує денатурований стан на тривалий час. Швидкість ренатурації тим більша, чим вища концентрація, однорідність та гомогенність молекул вихідної ДНК за їх нуклеотидними послідовностями.

ПИТАННЯ ДЛЯ ПЕРЕВІРКИ ЗНАНЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Дайте характеристику нуклеїнових кислот. Які функції вони виконують?
2. Дайте характеристику хімічної будови нуклеїнових кислот.
3. Які азотисті основи ви знаєте, до яких типів вони належать?
4. Охарактеризуйте первинну та вторинну структуру нуклеїнових кислот.

Чим вторинна структура ДНК відрізняється від вторинної структури РНК?

5. Який процес називається денатурацією ДНК? За допомогою яких методів його можна дослідити?

6. Що таке ренатурація? Які умови ренатурації ДНК?

4.3. ВУГЛЕВОДИ

Значення вуглеводів для рослинних і тваринних організмів винятково велике. Вуглеводи – основний живильний і головний опорний матеріал рослинних клітин і тканин. Вони складають до 85–90 % усієї маси рослинного організму. Відповідно до приблизних підрахунків щорічно на Землі утворюється більш 100 млн т вуглеводів у процесі фотосинтезу.

До складу вуглеводів входять вуглець, водень і кисень. Деякі вуглеводи, наприклад, наявний у грибах глюкозамін, містять також і азот. У більшості вуглеводів водень і кисень міститься в тому ж співвідношенні, що й у воді (наприклад, глюкоза $C_6H_{12}O_6$ або сахароза $C_{12}H_{22}O_{11}$).

Усі вуглеводи розділяють на дві групи – монози, або моносахариди, і поліози, або полісахариди. Кілька молекул моносахаридів, з'єднуючись між собою з виділенням води, утворюють молекулу полісахариду. Дві молекули моноз, з'єднуючись між собою, утворюють молекулу дисахариду з виділенням однієї молекули води. Типовими представниками групи дисахаридів є сахароза (тростниковий цукор), мальтоза (солодовий цукор) і целобіоза. Три молекули моноз, з'єднуючись із виділенням двох молекул води, утворюють молекулу трисахариду. До трисахаридів належить рафіноза. Вуглеводи, молекула яких складається зі з'єднаних залишків чотирьох моноз, називаються тетрасахаридами (стахіоза та ін.). Ди-, три- і тетрасахариди складають групу полісахаридів (поліоз) першого порядку. Усі представники цієї групи легко розчинні у воді та у чистому вигляді є кристалічними речовинами (олігосахариди). Більш складні вуглеводи, що міс-

тять у молекулі значно більшу кількість залишків простих цукрів, називаються полісахаридами (поліозами) другого порядку. Вони є складними речовинами з дуже великою молекулярною масою. У воді вони або не розчиняються зовсім, або дають колоїдні розчини. До числа полісахаридів другого порядку належать слиз, крохмаль, глікоген, клітковина, геміцелюлози, пектинові речовини тощо.

Моносахариди

Моносахариди можна розглядати як похідні багатоатомних спиртів. Одним із найпростіших багатоатомних спиртів є гліцерин. Під час окислення (дегідрування) гліцерину можна одержати два найпростіші моносахариди – гліцериновий альдегід і дигідроацетон (диоксиацетон), що відіграють важливу роль в обміні речовин живої клітини. Гліцериновий альдегід і диоксиацетон, які містять по три атоми карбону, належать до підгрупи **тріоз**. Моносахариди з чотирма атомами карбону в молекулі зуться **тетрози**, з п'ятьма – **пентози**, із шістьма – **гексози**, і сімома – **гептоди** (рис. 10). Найбільш важливими і розповсюдженими у природі є пентози і гексози.

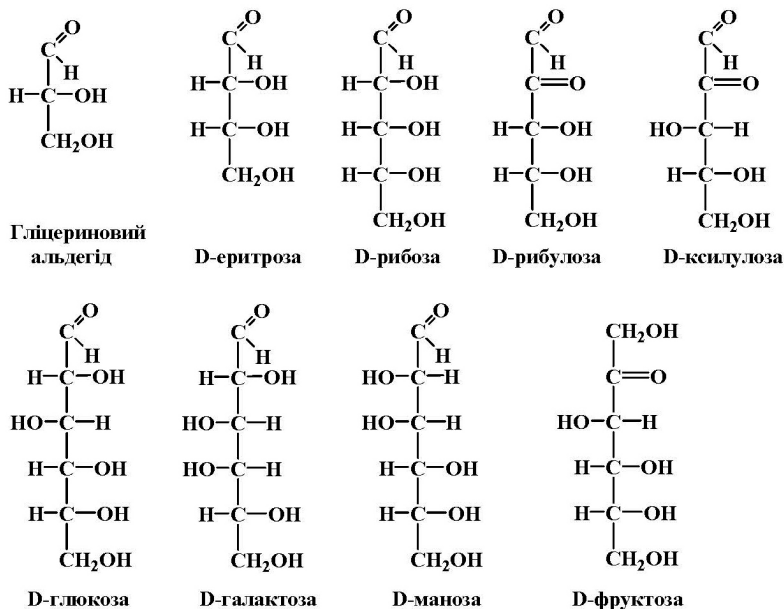


Рис. 10. Структурні формули деяких моносахаридів

На прикладі гліцеринового альдегіду і диоксиацетону можна бачити, що моносахариди містять у своїй молекулі поряд зі спиртовими групами (**ОН**) альдегідну (**СНО**) або кетонну (**С = О**) групу. Залежно від того, яку з цих груп вклю-

час молекула моносахариду, його називають **альдозою** або **кетозою**. Отже, гліцериновий альдегід є альдозою, а диоксиацетон кетозою.

Подібно до того, як можна одержати гліцериновий альдегід або диоксиацетон під час окислення триатомного спирту гліцерину, можна одержати будь-який інший моносахарид під час окислення відповідного багатоатомного спирту. Наприклад, під час окислення шестиатомного спирту сорбіту, що міститься у багатьох плодах, утворюється глюкоза або фруктоза. Під час окислення первинної спиртової групи $-\text{CH}_2\text{OH}$ утвориться альдоза, а під час окислення вторинної спиртової групи $-\text{CHOH}-$ кетоза. Ці перетворення залежно від умов можуть проходити у зворотному напрямку, коли з моносахариду утворюється відповідний багатоатомний спирт.

Моносахариди в розчинах можуть знаходитися в лінійній і циклічній формах. У альдоз є дві циклічні форми – піранозна і фуранозна (рис. 11). У кетоз – одна – фуранозна. За циклізації у моносахаридів з'являються асиметричні атоми карбону. Так у глюкози у піранозній формі асиметричним є другий атом вуглецю, а у фуранозній – перший і другий, а в кетози (фруктоза) – другий. У водному розчині моносахариду присутні одночасно всі його форми. За таких умов кількість нециклічної форми складає усього лише приблизно 3 %.

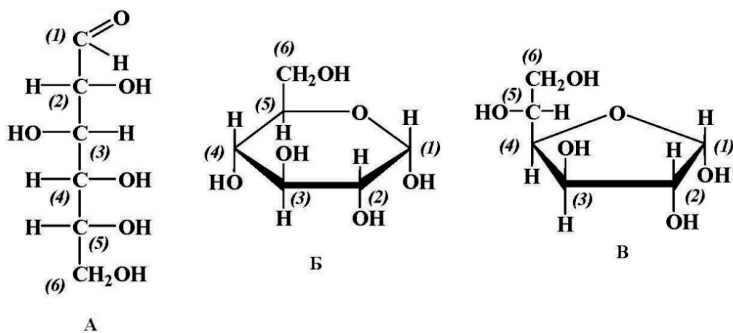


Рис. 11. Лінійна (А), піранозна (Б) та фуранозна (В) форми глюкози

Моносахариди, реагуючи з кислотами, можуть давати складні ефіри. Деякі з цих складних ефірів мають першорядне значення в обміні речовин. Такі, наприклад, фосфорнокислі ефіри глюкози і фруктози, що відіграють важливу роль у перетвореннях крохмалю і глікогену, а також у процесах дихання і бродіння – глюкозо-6-фосфат, глюкозо-1-фосфат, фруктозо-1,6-дифосфат і фруктозо-6-фосфат.

Серед пентоз найбільше значення у рослині мають ксиліза, арабіноза і рибоза та деякі інші. Так, рибулоза відіграє важливу роль як сполука, фосфорнокислий ефір якої зв'язує CO_2 у процесі фотосинтезу. Ксиліза і рибулоза у вигляді фосфорнокислих ефірів відіграють істотну роль у ферментативних взаємо-

перетвореннях різних моносахаридів. У ДНК міститься у фуранозній формі похідна рибози – 2-дезоксирибоза.

Під час окислення моносахаридів, залежно від умов, можуть утворюватися різні продукти. Якщо глюкозу окислювати за допомогою бромної води, то альдегідна група окислюється до карбоксильної, причому виникає глюконова кислота. Значні кількості глюконової кислоти утворюються під час розвитку деяких видів цвілевих грибів на розчинах, що містять глюкозу. За більш жорстких умов окислюється з утворенням карбоксилу не тільки альдегідна група, але і первинна спиртова група. За таких умов із глюкози утворюється цукрова кислота, а з галактози – слизова кислота. Окислення моносахаридів може також відбуватися з утворенням карбоксилу тільки за місцем першої спиртової групи. Кислоти, які виникають за цих умов, одержали загальну назву *уронових* кислот. Із глюкози у цьому випадку утворюється глюкуронова, з галактози – галактуоронова і з манози – мануронова кислота. Уронові кислоти легко утворюються в рослинні і мають важливе значення. Вони входять до складу пектинових речовин, деяких рослинних слизів та інших складних полісахаридів.

Окислення моносахаридів деякими слабкими окисниками, наприклад, лужними розчинами оксидів металів (міді, срібла, вісмуту) широко використовується для кількісного визначення цукрів. Так, визначаючи кількість оксиду міді (I), яка утворилася, можна за спеціальними таблицями розрахувати кількість цукру, що присутній у розчині (методи Бертрана, Починка).

Цукри, що мають вільну карбонільну групу (вільний глікозидний гідроксил) біля першого атому вуглецю, одержали назву редукуючих (відновлюючих) цукрів. До них належать усі моносахариди і деякі дисахариди.

Полісахариди

Полісахариди 1-го порядку (складні цукри, або олігосахариди). Ди-, три- і тетрасахариди називають також *олігосахаридами*, тобто полісахаридами, які складаються з невеликої кількості залишків моноз («олігос» по-грецьки – небагато).

Дисахариди. Дисахариди побудовані зі з'єднаних між собою залишків двох молекул моносахаридів. Під час їх утворення можуть з'єднуватися дві гексози, дві пентози або ж гексоза і пентоза. Дисахариди є глікозидами, тому що поєднання двох молекул моносахаридів відбувається завдяки глікозидному гідроксилу одного моносахариду та однієї з гідроксильних груп іншого моносахариду (рис. 10); внаслідок цього виділяється одна молекула води і утворюється молекула дисахариду. Під час нагрівання з кислотами або під дією відповідних ферментів відбувається гідроліз дисахаридів – розпад на дві молекули моносахаридів.

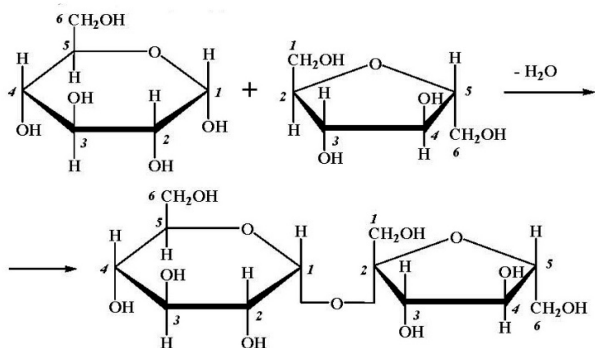


Рис 12. Утворення глікозидного зв'язку

Найважливішими представниками дисахаридів (рис. 13) є *сахароза* (тростниковий цукор, буряковий цукор), *мелібіоза*, *лактоза* (молочний цукор), *мальтоза* (солодовий цукор), *трегалоза* (грибний цукор).

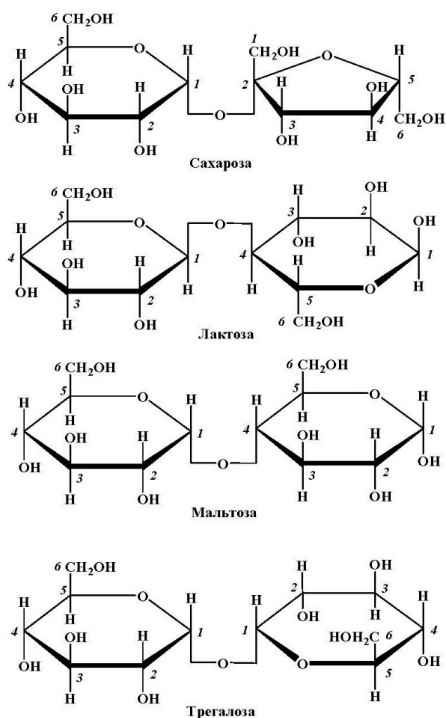


Рис. 13. Структурні формули деяких дисахаридів

Гентиобіоза. Дисахарид, що входить до складу багатьох глікозидів, із яких найбільш важливіми є амігдалін і кроцин. У зв'язаному вигляді гентиобіоза міститься в коренях різних видів тирличу (*Gentiana*), від якої й одержала свою назву. Під час гідролізу гентиобіоза утворює дві молекул D-глюкози. У молекулі гентиобіози залишки глюкози зв'язані завдяки глікозидному гідроксилу однієї молекули глюкози і гідроксилу, що знаходиться біля 6-го вуглецевого атома іншої молекули глюкози. Оскільки гентиобіоза містить вільний глікозидний гідроксил, вона відновлює фелінгову рідину та у розчинах виявляє мутаротацію.

Трегалоза і гентиобіоза, очевидно, утворюються у крохмале-патоковому виробництві під час

кислотного гідролізу крохмалю внаслідок вторинних реакцій конденсації глюкози («реверсія» глюкози).

Целобіоза. Вона є основною будівельною одиницею клітковини (целюлози). У вільному стані міститься в соку (пасоці) деяких дерев. Оскільки в молекулі целобіози є вільний глікозидний гідроксил, вона відновлює фелінгову рідину та у водних розчинах виявляє мутаротацію. Від мальтози відрізняється наявністю β -1,4-глюкозидного зв'язку.

Трисахариди. Рафіноза (мелітриоза) $C_{18}H_{32}O_{16}$. Зустрічається у багатьох рослинах, зокрема у насінні бавовнику і засохлих виділеннях (манні) евкаліпта. Міститься у цукровому буряку, накопичуючись у великих кількостях у м'ясі під час виробництва бурякового цукру. У свіжозібраних коренях цукрового буряка, які містять до 20 % сахарози, рафіноза складає від 0,2 до 1 % у розрахунок на сахарозу. Цікаво, що під час зберігання буряка вміст рафінози зростає.

Тетрасахариди. У багатьох рослинах міститься тетрасахарид, що одержав назву *стахіоза* (рис. 14). Стахіоза є сполученням двох залишків галактози. Стахіоза частково піддається бродінню дріжджами. У ній відсутні вільні глікозидні гідроксили, тому вона не відновлює фелінгову рідину. Стахіоза міститься в коренях *Stachys*, у насінні жовтого люпину, сої, гороху, сочевиці, у «манні» деяких видів ясеня.

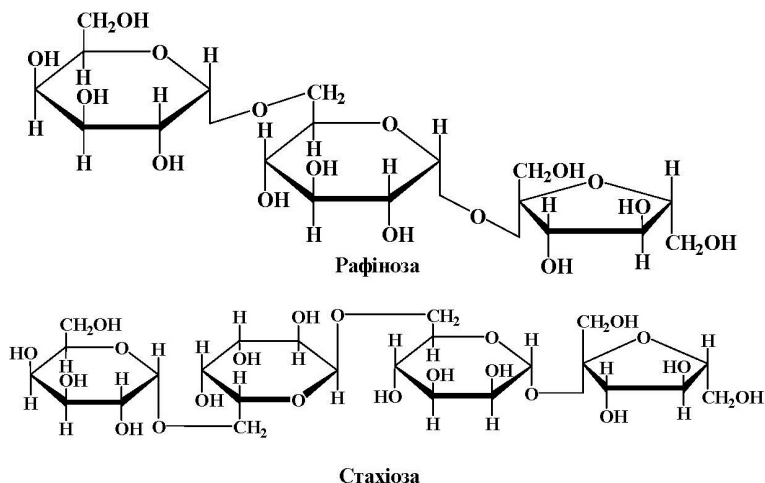


Рис. 14. Структурні формули трисахариду (рафіноза) та тетрасахариду (стахіоза)

Полісахариди 2-го порядку (поліози). Велика частина вуглеводів, що входять у групу полісахаридів 2-го порядку, є речовинами з великою молекулярною масою, нерозчинними у воді, або які утворюють колоїдні розчини. Високомолекулярні вуглеводи надзвичайно важливі в обміні речовин рослин.

Крохмаль. У рослинах він знаходиться у вигляді крохмальних зерен, що розрізняються за своїми властивостями і хімічним складом. Характерною властивістю крохмалю є його здатність забарвлюватися в синій колір під час додавання розчину йоду у водному розчині йодиду калію. Користуючись цим реактивом, можна знайти дуже малі кількості крохмалю. Поява синього кольору обумовлюється, очевидно, утворенням комплексних і адсорбційних сполук між йодом і крохмалем.

Крохмаль складається з полісахаридів двох типів, що розрізняються за своїми фізичними і хімічними властивостями, – *амілози* та *амілопектину* (рис. 15). Амілоза легко розчиняється в теплій воді і дає розчини з порівняно невисокою в'язкістю. Амілопектин розчиняється у воді лише за умови нагрівання під тиском і дає дуже густі розчини. Підвищити розчинність амілопектину можна, використовуючи розчини солей. Цей прийом використовують для екстракції крохмалю (наприклад, у методі Починка застосовується 80 % розчин нітрату кальцію).

У молекулі амілози залишки глюкози зв'язані глікозидними зв'язками між 1-м і 4-м вуглецевими атомами і утворюють довгий ланцюжок (рис. 15). У молекулі амілопектину глюкозні залишки з'єднані глікозидними зв'язками не тільки між 1-м і 4-м вуглецевими атомами, але також між 1-м і 6-м та утворюють розгалужену структуру.

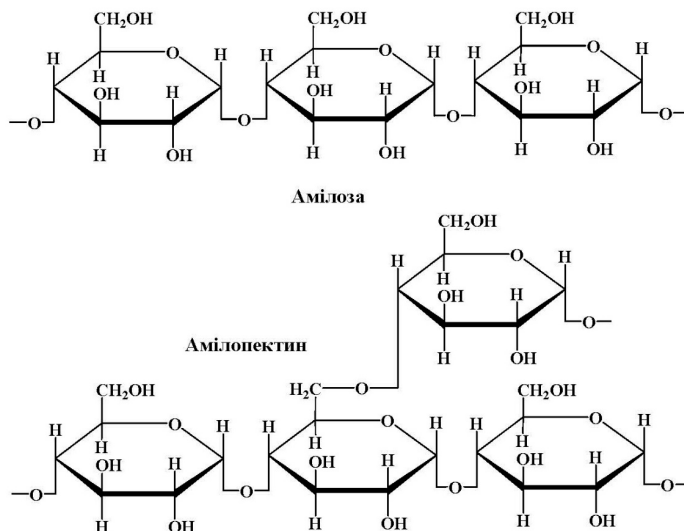


Рис. 15. Структурна формула крохмалю

Необхідно зазначити, що вміст амілози та амілопектину у крохмалі може змінюватися залежно від сорту рослини і від того, з якої частини рослини він отриманий.

Під час кип'ятіння з кислотами крохмаль перетворюється на глюкозу. За умови більш слабого впливу кислот (наприклад, 7,5 % HCl протягом семи днів за кімнатної температури) утворюється так званий «розчинний крохмаль», часто застосовуваний у лабораторіях. Продуктами неповного гідролізу крохмалю є декстрини.

Клітковина (целюлоза). Полісахарид, який складає головну масу клітинних стінок рослин. Він є найбільш розповсюдженою на Землі органічною сполукою. Клітковина нерозчинна у воді, а тільки набухає в ній. Клітковина складає біля 50 % деревини. У волокнах бавовни вона складає більше 90 %. Під час кип'ятіння з міцною сірчаною кислотою клітковина перетворюється на глюкозу. За умови більш слабого гідролізу з клітковини утворюється целобіоза (рис. 16). У молекулі клітковини залишки целобіози зв'язані глікозидними зв'язками у вигляді довгого ланцюжка.

Молекулярна маса клітковини точно не встановлена. Припускають, що вона не є індивідуальною речовиною, а є сумішшю гомологічних речовин. Молекулярні маси клітковини, отримані з різних джерел, доволі сильно коливаються. Однак за допомогою рентгеноструктурного аналізу встановлено, що молекули клітковини мають нитковидну форму. Ці нитковидні молекули з'єднуються в пучки – міцели. Кожна міцела складається приблизно з 40–60 молекул. З'єднання окремих молекул клітковини в міцели відбувається завдяки водневим зв'язкам, які утворюються і завдяки водневим атомам гідроксильних груп клітковини, і завдяки адсорбованим клітковиною молекулам води.

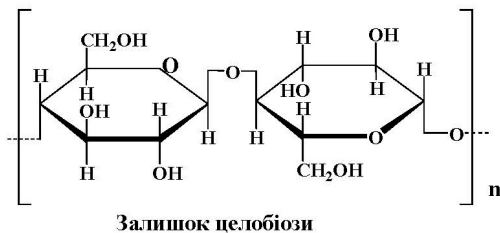


Рис. 16. Структурна одиниця целюлози

У клітинних стінках рослин міцели клітковини зв'язані водневими зв'язками з різними гетерополісахаридами. Наприклад, у білого клена ними є з'єднані між собою глікозидними зв'язками *ксилоглюкан*, що складається з залишків глюкози, ксилози, галактози і фруктози; *арабіногалактан*, побудований із залишків арабінози і галактози; *рамногалактуронан*, утворений залишками галактуронової кислоти і рамнози. До того ж є дані про те, що в побудові клітинної стінки рослин, особливо на ранніх етапах її утворення, бере участь також особливий, багатий оксипроліном глікопротеїд *екстензин*. Під час одерев'яніння клітинних стінок у них накопичується також лігнін.

Геміцелюлози (напівклітковини). Під цією назвою поєднують велику групу високомолекулярних полісахаридів, які не розчиняються у воді, але розчинні у

лужних розчинах. Геміцелюлози містяться у значній кількості у здеревілих частинах рослин, соломі, насінні, горіхах, деревині, кукурудзяних початках.

Геміцелюлози гідролізуються кислотами легше, ніж клітковина. Під час гідролізу утворюються маноза, галактоза, арабіноза або ксилоза і тому відповідно носять назви – манани, галактани і пентозани (арабан або ксилан).

Пектинові речовини. Це високомолекулярні сполуки вуглеводної природи, які містяться у великій кількості в ягодах, фруктах, бульбах і стеблах рослин. У рослинах пектинові речовини присутні у вигляді нерозчинного протопектину, який є сполукою метоксильованої полігалактуронової кислоти з галактаном і арабаном клітинної стінки. Протопектин переходить у розчинний пектин лише після обробки розведеними кислотами або під дією особливого ферменту протопектинази. З водного розчину розчинний пектин осаджується спиртом або 50 % ацетоном. Характерною і важливою властивістю пектину є його здатність давати драгли за присутності кислоти і цукру.

Метоксильована полігалактуронова кислота – розчинний пектин із молекулярною масою від 25 000 до 360 000.

Пектинові речовини відіграють важливу роль під час дозрівання, збереження та промислової переробки різних плодів і овочів. Під час розвитку плодів протопектин відкладається у клітинних стінках і може накопичуватися у плодах у значних кількостях (наприклад, у грушах, яблуках і плодах цитрусових культур). Дозрівання плодів характеризується перетворенням протопектина в розчинний пектин.

ПИТАННЯ ДЛЯ ПЕРЕВІРКИ ЗНАЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Дайте характеристику вуглеводів. Яке значення мають ці речовини для рослин?
2. На які групи поділяються вуглеводи?
3. Наведіть характеристику моносахаридів. Назвіть представників моносахаридів із різною кількістю атомів вуглецю.
4. Чим відрізняються альдози від кетоз?
5. Що таке редукуючі цукри? Як можна визначити їх кількість у рослинах?
6. Яке значення моносахаридів у життєдіяльності рослин?
7. Охарактеризуйте полісахариди 1-ї групи. Як утворюється глікозидний зв'язок?
8. Які з дисахаридів належать до редукуючих цукрів? Чому?
9. Які цукри належать до розчинних? Чи є різниця між групами розчинних і редукуючих цукрів?
10. Які цукри належать до полісахаридів 2-ї групи? Наведіть їх характерні властивості.

11. Дайте характеристику будови молекули і властивостей крохмалю. Яке значення має цей полісахарид для рослин?

12. Охарактеризуйте будову та властивості целюлози (клітковини).

13. Охарактеризуйте геміцелюлози. З яких мономерів вони складаються? Яке значення мають у життєдіяльності рослин?

14. Які речовини належать до групи пектинів? Які особливості будови молекул пектинових речовин? Яке значення вони мають?

4.4. ЛІПІДИ

Жири і речовини, зазвичай називані ліпоїдами, поєднують в одну групу; їх загальна властивість – гідрофобність і нерозчинність у воді. Наразі жири і жироподібні речовини (ліпоїди) поєднують загальним терміном **ліпіди**. Речовини цієї групи доволі різні за хімічною природою, але усі розчиняються в органічних розчинниках: ефірі, бензині, бензолі, хлороформі. Характерна риса таких розчинників, так само, як і речовин, що належать до зазначеної групи, – високий вміст у них гідрофобних радикалів і угруповань. До групи ліпідів належать також хлорофіли і каротиноїди, нерозчинні у воді, але розчинні в неполярних розчинниках (хлороформі, вуглеводнях, спиртах).

Ліпіди відіграють надзвичайно важливу роль в організмі. Жири – найважливіші запасні речовини, які накопичуються у значних кількостях у деяких плодах і насінні, у мікроорганізмах. Воски відіграють захисну роль, покриваючи поверхню листя і плодів. Фосфоліпіди, гліколіпіди і стероїди – найважливіші компоненти біологічних мембран, що оточують протоплазму та субклітинні структури: ядро, мітохондрії, пластиди, лізосоми. Хлорофіл і каротиноїди беруть участь у процесі фотосинтезу.

Жири

Жири – запасні речовини, що накопичуються в дуже великих кількостях у насінні і плодах багатьох рослин. Середній вміст жиру в насінні і плодах культурних рослин коливається від 2 % у гороху до 60 % у рицини.

За хімічною будовою жири – суміш складних ефірів (гліцеридів) триатомного спирту гліцерину і високомолекулярних жирних кислот (рис. 17).

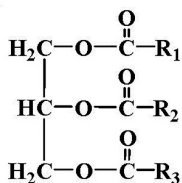


Рис. 17. Структура жирів

Жирні кислоти, які найбільш часто входять до складу жирів: пальмітинова ($\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2$), стеаринова ($\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{O}_2$), арахідова ($\text{C}_{20}\text{H}_{40}\text{O}_2$), бегенова ($\text{C}_{22}\text{H}_{44}\text{O}_2$), олеїнова ($\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$), синселева ($\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_2$), ліноленова ($\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{O}_2$). Усі жирні кислоти, що входять до складу жирів, поділяють на дві групи: насичені, які не мають подвійних зв'язків, і ненасичені, які містять подвійні зв'язки. До насичених кислот

належать пальмітинова, стеаринова, арахінова і бегенова кислоти, а до ненасичених – олеїнова, синелева і ліноленова кислоти.

Рослинні жири, або олії, багаті ненасиченими жирними кислотами, тому у переважній більшості випадків вони є рідкими за звичайної температури. Олії деяких рослин містять значні кількості специфічних жирних кислот, характерних саме для цих рослин.

У мембранах хлоропластів рослин і в деяких фотосинтезуючих бактеріях знайдені помітні кількості гліцеридів, які поряд із залишками гліцерину і жирної кислоти містять також один, два або більше залишків цукрів. У хлоропластах зеленої одноклітинної водорості *Chlorella* та вищих рослин міститься гліцерид, що складається з двох залишків жирних кислот, гліцерину і сульфоглюкози. Наявні експериментальні дані вказують на те, що галактоліпіди та сульфоліпіди відіграють важливу роль у структурі мембран хлоропластів.

За умови дії кислот і лугів на жири відбувається розщеплення складноефірного зв'язку – так зване омилення жиру, що супроводжується утворенням вільного гліцерину і жирних кислот або їх солей, називаних милами.

Властивості цього жиру характеризуються його «числами» – кислотним числом, йодним числом, числом омилення тощо.

Кислотне число – кількість міліграмів їдкого калію, необхідна для нейтралізації вільних жирних кислот, які містяться в одному грамі жиру. **Йодне число** – кількість грамів йоду, що зв'язується 100 г цього жиру. Оскільки приєднання йоду відбувається за місцем подвійних зв'язків, які є в ненасичених жирних кислотах, йодне число дає уявлення про вміст у жирі ненасичених кислот. **Число омилення** – кількість міліграмів їдкого калію, необхідна для нейтралізації і вільних, і зв'язаних із гліцерином жирних кислот, які утворюються під час омилення 1 г олії.

Воски

Воски покривають тонким шаром листя, стебла, стовбури і плоди рослин. Восковий наліт на плодах винограду, яблук, груш та сливи попереджає їх змочування водою, висихання і проникнення мікроорганізмів. Воски – це жироподібні речовини, тверді за звичайної температури. Це складні ефіри, утворені жирними кислотами і високомолекулярними одноатомними спиртами жирного (рідше ароматичного) ряду. Природні воски містять деяку кількість вільних жирних кислот та високомолекулярних спиртів, а також вуглеводнів парафінового ряду. До складу восків входять і звичайні жирні кислоти, які містяться в жирах (пальмітинова, стеаринова, олеїнова тощо), і жирні кислоти, характерні для восків, що мають набагато більші молекулярні маси (карнаубова ($C_{24}H_{48}O_2$), церотинова ($C_{27}H_{54}O_2$), монтанова ($C_{29}H_{58}O_2$) та ін.).

Фосфоліпіди

Фосфоліпіди так само, як і жири, – гліцериди, тобто складні ефіри гліцерину і жирних кислот. Від справжніх жирів відрізняються тим, що містять фосфорну кислоту (рис. 18).

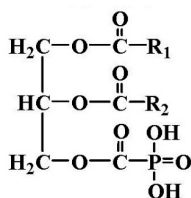


Рис. 18. Структура фосфоліпідів

Із азотистих основ до складу фосфоліпідів може входити *холін* – сильна основа, легко розчинна у воді і спирті, але нерозчинна у ефірі. Холін відіграє важливу роль в обміні речовин, тому що під дією відповідних ферментів він може передавати метильні групи, які містяться у ньому, іншим речовинам. Фосфоліпіди, які складаються з залишків гліцерину, жирних кислот, фосфорної кислоти і холіну, називають **лецитинами**, або **холінфосфогліцеридами**. Фосфоліпіди, називані **кефалінами**, або **етаноламінфосфогліцеридами**, відрізняються від лецитинів тим, що в них замість холіну міститься *етаноламін*. Подібно до кефалінів побудовані фосфоліпіди, названі **фосфатидилсеринами**, але замість етаноламіну вони містять залишок амінокислоти *серину*. Лецитини, кефаліни і фосфатидилсерини переважають у мембранах мітохондрій. Розмаїтість лецитинів, кефалінів та фосфатидилсеринів залежить від природи залишків жирних кислот, які містяться у них, і від місця зв'язку їх із залишками гліцерину. У рослинах знайдені також фосфоліпіди, які містять азотисті основи, – **фосфатидні кислоти**. Вони виявлені в зародках пшениці, листах капусти та інших рослин, а також у молочному соку тропічного каучуконосного дерева *Hevea brasiliensis*. Фосфатидні кислоти знаходяться у рослинах у формі кальцієвих, магнієвих і калієвих солей. Фосфатидні кислоти можуть приєднувати в собі ще один залишок гліцерину та утворювати **фосфатидилгліцерин**. Фосфатидилгліцерин у великих кількостях міститься у хлоропластах, складаючи до 50 % від загального вмісту ліпідів у листі. У багатьох рослинних фосфоліпідах виявлені цукри: глюкоза, галактоза або пентоза.

ПИТАННЯ ДЛЯ ПЕРЕВІРКИ ЗНАНЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Які сполуки належать до ліпідів? У чому полягає їх відмінність?
2. Дайте характеристику жирів. Яка характерна особливість притаманна жирам рослин?
3. Охарактеризуйте воски. У чому особливість їх хімічного складу? Яке їх значення у життєдіяльності рослин?
4. Наведіть характеристику фосфоліпідів. У чому полягають особливості їх будови? Яке значення фосфоліпідів у життєдіяльності рослин?

4.5. ВІТАМІНИ

Вітаміни – це група порівняно низькомолекулярних органічних сполук різноманітної хімічної будови, поєднуваних за ознакою їх строгої необхідності. Вітаміни потрібні в мізерно малих кількостях і виконують в організмі каталітичні функції. Вони були відкриті у 1880 р. російським вченим М. Луніним. За пропозицією польського вченого К. Функа речовини, які містяться у їжі в доволі незначних кількостях, але відіграють важливу роль в обміні речовин, були названі *вітамінами*. Наразі відкрито велику кількість різних вітамінів і з'ясовано їх хімічну природу. Вітаміни необхідні для нормальної життєдіяльності вищих рослин і мікроорганізмів.

Вітаміни можуть бути розділені за ознакою розчинності на дві великі групи – *вітаміни, розчинні в жирах*, і *вітаміни, розчинні у воді*.

Вітаміни, розчинні в жирах

Група вітамінів А. Вітаміни групи А – похідні каротину. Вони нерозчинні у воді, але розчиняються в різних жирових розчинниках і жирах. Відсутність у їжі вітамінів групи А проявляється в порушенні росту, зниженні стійкості до захворювань і ослабленні зору. Ці вітаміни зустрічаються винятково у тканинах тварин і продуктах тваринного походження, у рослинах вони відсутні. Однак утворюються вони з каротиноїдів, широко розповсюджених у рослинах. Установлено, що вітамін А утворюється у тваринному організмі з каротину під дією особливих ферментів. Так, *Вітамін А₁* є половиною молекули β-каротину (рис. 19), що містить спиртову групу.

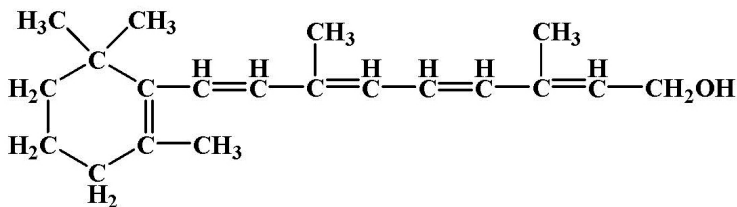


Рис. 19. Структурна формула вітаміну А

Вітамін А₂ був відкритий у печінці прісноводних риб. Цей вітамін відрізняється від вітаміну А₁ своєю емпіричною і структурною формулами. Вітамін А₂ містить шість подвійних зв'язків, водночас вітамін А₁ – п'ять. Найбільш важливими джерелами вітаміну А в їжі людини є листові зелені (салат, шпинат, зелена цибуля та інші), морква, томати, а також вершкова олія і яєчний жовток.

Група вітамінів D. Недостатній вміст у їжі цих вітамінів призводить до виникнення рахіту. Вони нерозчинні у воді, але розчиняються в жирах. Вітаміни групи D зустрічаються тільки у тваринному організмі. У рослинах містяться

стероли, з яких під впливом ультрафіолетового опромінення утворюються вітаміни цієї групи. Найбільш важливим з цих стеролів є *ергостерол*, який міститься у великій кількості у дріжджах і цвілевих грибах, використовуваних як вихідний продукт для промислового одержання вітаміну D. Відомі *вітамін D₂*, *вітамін D₃*, *вітамін D₄*.

Вітамін E (токоферол). Нестача вітаміну E в кормах призводить до порушень статеві функції тварин – у самців порушується утворення спермій, а в самок спостерігаються безплідність або передчасні пологи, а також нервово-м'язові розлади у приплоду. Вітамін E представлений чотирма ізомерами. Найбільш багаті вітаміном E зародки злаків і зелені листки рослин. Токофероли охороняють рослинні олії від окислення і прогіркання (як антиокисники).

Група вітамінів K. Під цією назвою поєднується група так званих антигеморагічних факторів, необхідних для нормального згортання крові. Ці вітаміни поширені у продуктах рослинного і тваринного походження. Вони розчинні в більшості органічних розчинників, але нерозчинні у воді. Кращими джерелами вітамінів K є зелені частини рослин. За своєю хімічною природою вітаміни групи K є похідними нафтохінону. Ці вітаміни відіграють важливу, але поки нез'ясовану роль у процесі фотосинтезу.

Водорозчинні вітаміни

Вітамін B₁ (аневрин, тіамін). Ранні симптоми нестачі вітаміну B₁ полягають у порушеннях нервової системи – недостатній концентрації уваги, швидкій розумовій і фізичній стомлюваності, легкій збудливості, поганому апетиті. Водночас підвищується зміст піровиноградної кислоти в крові і сечі. Багаті вітаміном B₁ пшеничні і рисові висівки, зародки злаків, внутрішні органи тварин (печінка, нирки і серце). Особливо багаті вітаміном B₁ дріжджі. Вітамін B₁ у чистому кристалічному вигляді має форму дрібних безбарвних кристаликів, що мають гіркий смак, які легко розчиняються у воді.

Фосфатний ефір вітаміну B₁, з'єднуючись зі специфічним білком, утворює піруватдекарбоксилазу, яка розщеплює піровиноградну кислоту на оцтовий альдегід і CO₂. Тіамініпірофосфат входить також до складу комплексу ферментів, які каталізують окисне декарбоксилювання кетокислот.

Вітамін B₂ (рибофлавін). Нестача рибофлавіну в їжі викликає порушення апетиту, падіння ваги, слабкість, різь в очах, хворобливі відчуття у слизових оболонках рота. Рибофлавін, так само, як і тіамін, розчиняється у воді. У рибофлавіні азотиста основа (6,7-диметил-ізоалоксазин), зв'язана із залишком багатоатомного спирту D-рибіту, який утворюється під час відновлення цукру D-рибози. Рибофлавін у поєднанні з фосфорною кислотою входить до складу низки ферментів, які відіграють важливу роль в обміні речовин. Сполуку рибофлавіну з фосфорною кислотою називають флавінмононуклеотидом.

Вітамін В₆ (піридоксин). Відсутність або нестача вітаміну В₆ у їжі приводить до порушень білкового обміну і синтезу жирів у тваринному організмі. Вітамін В₆ розчинний у воді. Роль вітаміну В₆ в обміні речовин полягає в тому, що його альдегідне похідне у вигляді фосфатного ефіру входить до складу ферментів, які каталізують різні перетворення амінокислот.

Вітамін РР (нікотинова кислота). Відсутність або нестача нікотинової кислоти призводить до захворювання, яке називається пелагра. Характерними симптомами цієї хвороби є ураження шкіри, поноси, психічні розлади. Фізіологічна роль нікотинової кислоти полягає в тому, що у вигляді амідів вона входить до складу окисно-відновних ферментів дегідрогеназ.

Пантотенова кислота. До складу пантотенової кислоти входить як її частина залишок α -аланіну, зв'язаний із диметилксимасляною кислотою. Нестача пантотенової кислоти викликає у тварин затримку росту, ураження шкіри, порушення діяльності нервової системи і шлунково-кишкового тракту. Пантотенова кислота входить до складу коферменту А, за участю якого відбуваються активування і перенос залишків оцтової кислоти, що утворюються в організмі, і інших кислотних залишків, синтез лимонної кислоти, жирних кислот, стеролів, гліцеридів і багатьох інших сполук.

Біотин (вітамін Н). Є важливим чинником росту для дріжджів і деяких мікроорганізмів. Нестача біотину в дієті призводить до ураження шкіри та нігтів, випадіння волосся.

Фолієва кислота. Ця назва дана тому, що вітамін був виділений із листя (латинською «*folium*»). Фізіологічна дія фолієвої кислоти особливо добре вивчена на різних тваринах і деяких мікроорганізмах (*Lactobacillus casei*, *Streptococcus faecalis*), для яких вона слугує важливим фактором росту. Участь фолієвої кислоти в обміні речовин полягає в тому, що вона у відновленій формі є необхідним складником (коферментом) низки ферментів, які каталізують активування і перенос груп, що містять один вуглецевий атом.

Вітамін С (аскорбінова кислота). Недостатній вміст вітаміну С (рис. 20) у їжі призводить до виникнення цинги. Аскорбінова кислота поширена і у рослинах, і у тваринних тканинах. Важлива роль аскорбінової кислоти і її участь в окисно-відновних процесах, які відбуваються у живій клітині, пов'язані з тим, що вітамін існує у двох формах: власне аскорбінова кислота і окислена форма – дегідроаскорбінова кислота; остання після відновлення знову дає аскорбінову кислоту). Взаємоперетворення аскорбінової і дегідроаскорбінової кислот у рослин-

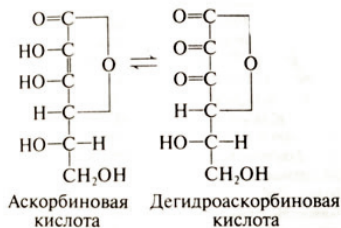


Рис. 20. Перетворення вітаміну С

ному організмі у найтісніший спосіб пов'язані з ферментативними взаємоперетвореннями окисленого і відновленого глутатіону.

І аскорбінова, і дегідроаскорбінова кислоти фізіологічно активні. Аскорбінова кислота – це безбарвні кристали кислого смаку, добре розчиняються у воді, легко руйнуються в розчинах, особливо у присутності повітря, світла і слідів міді або заліза.

ПИТАННЯ ДЛЯ ПЕРЕВІРКИ ЗНАТЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Дайте характеристику вітамінів. На які групи поділяються ці речовини?
2. Наведіть характеристику основних жиророзчинних вітамінів.
3. Охарактеризуйте вітамін А. Із яких речовин рослинного походження він утворюється?
4. Дайте характеристику водорозчинних вітамінів. Які водорозчинні вітаміни ви знаєте?
5. Яке значення у життєдіяльності рослинних та тваринних організмів мають вітаміни групи В?
6. Охарактеризуйте вітамін С. Яке його значення у життєдіяльності організмів?

4.6. РЕЧОВИНИ ВТОРИННОГО ПОХОДЖЕННЯ

У рослинах поряд із білками, нуклеїновими кислотами, вуглеводами, ліпідами і вітамінами містяться різні речовини, названі речовинами вторинного походження. Часто вони відіграють досить важливу роль в обміні речовин рослин. Багато з цих речовин, наприклад, деякі органічні кислоти, утворюючись у рослині, відразу використовуються рослинною клітиною для різних синтетичних процесів; вони не накопичуються в рослині у великій кількості і є проміжними продуктами обміну речовин. Деякі з цих речовин, накопичуючись у рослинах нерідко у великій кількості (фенольні сполуки, каучук, ефірні олії), обумовлюють цим специфіку їх обміну. Багато з них є найважливішими фізіологічно активними сполуками, активними регуляторами росту рослин. Звідси випливає, що термін «речовини вторинного походження» потрібно застосовувати як досить умовний.

У рослинах міститься величезна розмаїтість речовин вторинного походження. Найважливіші з них – гідроароматичні сполуки, які зустрічаються в рослинах у вільному стані, а також у вигляді ефірів; фенольні сполуки (велика і надзвичайно широко розповсюджена група сполук, яка відіграє важливу роль в обміні речовин); глікозиди (речовини, які визначають смак і аромат деяких харчових продуктів рослинного походження. Багато з глікозидів широко застосовуються в медицині як лікарські речовини); ефірні олії (летючі речовини, які містяться в

багатьох рослинах. Використовуються як запашні речовини в парфумерній промисловості); смоли, каучук і гута (речовини, які мають винятково важливе значення у низці галузей промисловості. Їх одержують із каучуконосних рослин); алкалоїди (азотисті гетероциклічні сполуки, які чинять досить сильну фізіологічну дію на тваринний організм; багато з них застосовуються в медицині); регулятори росту рослин і мікроорганізмів; антибіотики (різноманітні речовини, які чинять сильну стимулюючу або затримуючу дію на ріст вищих рослин і мікроорганізмів. Деякі з них широко застосовуються в медицині для боротьби з хвороботворними мікробами).

Однією з речовин цієї групи є *лігнін*. Лігнін не є індивідуальною сполукою строго визначеного складу. Він інкрустує целюлозні фібрили і завдяки цьому бере участь у створенні опорних елементів рослинних тканин. Характер зв'язку між лігніном і вуглеводними компонентами деревини ще не встановлений.

Лігнін може бути переведений у розчинний стан обробкою деревини гідросульфитом і сірчистою кислотою. На цьому оснований спосіб видалення лігніну з деревини, яка йде на отримання целюлози і паперової маси. Величезні кількості технічного лігніну утворюються як відхід на гідролітичних заводах під час гідролізу деревини кислотами.

Важлива властивість лігніну – стійкість до мікроорганізмів. Лише деякі з них, і то порівняно повільно, руйнують лігнін.

За своєю хімічною природою лігнін – тримірний полімер фенольної природи. Під час окислення нітробензолом у лужному середовищі він розщеплюється з утворенням ароматичних альдегідів: ваніліну, бузкового альдегіду і п-оксибензальдегіду. Відносний вихід ароматичних альдегідів різний для різних рослин.

Вихідними фенольними мономерами в біосинтезі лігніну слугують коричні спирти (рис. 21).

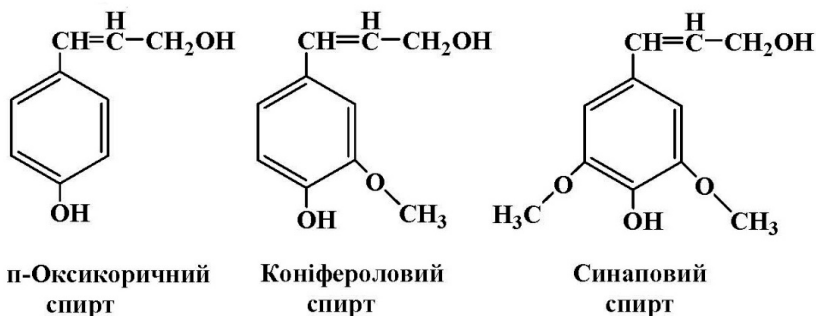


Рис. 21. Структурні формули коричних спиртів

Коніферилловий спирт міститься у камбіальній тканині деревних рослин у вигляді глюкозиду коніферину. Під дією пероксидази коричневі спирти піддаються оксидній конденсації, яка протікає з проміжним утворенням вільних радикалів. Коніферин попередньо розщеплюється глюкозидазою, яка присутня у камбії.

ПИТАННЯ ДЛЯ ПЕРЕВІРКИ ЗНАНЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

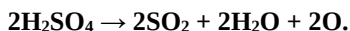
1. Дайте характеристику речовин вторинного походження. Чому ця група отримала таку назву?
2. Які речовини входять до групи речовин вторинного походження? Яке значення вони мають?
3. Охарактеризуйте лігнін (будова молекули, властивості, значення для рослин).

5. АНАЛІЗ МІНЕРАЛЬНОГО СКЛАДУ РОСЛИН

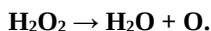
ПІДГОТОВКА РОСЛИННОГО МАТЕРІАЛУ ДО АНАЛІЗУ

1. Мокре озолення рослин у сірчаній кислоті з пероксидом водню

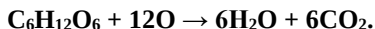
Принцип методу. Рослинну речовину озоліють за температури 338 °С у сірчаній кислоті з пероксидом водню у присутності селену як каталізатора. Хімічні процеси, що протікають під час озолення органічних речовин рослини в сірчаній кислоті, досить різноманітні й складні. У схематичному вигляді їх можна уявити у такий спосіб: під час взаємодії концентрованої сірчаної кислоти з органічними речовинами відбувається відщиплення води та обвуглювання з виділенням вуглецю, а також гідроліз білків на пептиди та амінокислоти. Одночасно, взаємодіючи з рослинною речовиною за температури кипіння (338 °С), сірчана кислота розпадається:



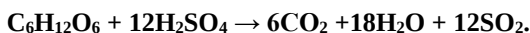
В аналогічний спосіб взаємодіє і пероксид водню: у присутності рослинного матеріалу вона розпадається на воду та атомарний кисень:



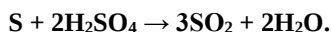
Останній окислює органічні сполуки до води і вуглекислоти:



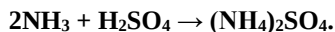
Кипляча сірчана кислота, вступаючи в реакцію з безазотистими органічними речовинами, руйнує їх до вуглекислоти та води; відбувається розкладання сірчаної кислоти до сірчастого газу та води:



Сірка, яка виділяється із сірковмісних білків, окислюється за схемою:

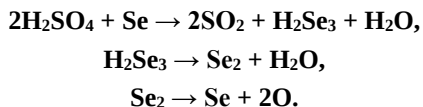


Азотисті сполуки (білки, амінокислоти та ін.) за участі каталізатора селену окислюються атомарним киснем, який виділяється під час розкладання сірчаної кислоти та пероксиду водню до вуглекислоти, води і аміаку, що зв'язується вільною сірчаною кислотою за схемою:



Сірчастий газ, діоксид вуглецю та вода, які виділяються у процесі озолення рослинної речовини, випаровуються.

Роль селену у процесі озолення рослинної речовини полягає у підвищенні температури кипіння сірчаної кислоти, посиленні процесів гідролізу, розпаду та окислення органічних сполук. Легко окислюючись киплячою сірчаною кислотою, селен перетворюється у донора атомарного кисню за схемою:



На кожен кубічний сантиметр сірчаної кислоти, використаної для озолення, необхідно додавати 0,005 г металевого селену.

Перебіг аналізу. На аналітичних терезах (із точністю до 0,0002 г) відважують 0,15–0,20 г подрібненого повітряно-сухого рослинного матеріалу та примішують його в колбу К'єльдаля. Одночасно визначають гігроскопічну вологу аналізованого матеріалу.

У колбу доливають 5–10 мл сірчаної кислоти густиною 1,84. Ретельно та обережно перемішують вміст і ставлять колбу у штатив на 10–15 год (на ніч) для повільного обвуглювання рослинного матеріалу.

Після цього в колбу додають 12 мл 30 % пероксиду водню, опускають кілька кристалів подрібненого селену, вміст колби ще раз обережно перемішують і встановлюють у нагрівальний апарат у витяжній шафі, обережно нагріваючи до слабого кипіння.

Наважки рослинних проб у колбах К'єльдаля краще заливати сірчаною кислотою з розчиненням у ній під час нагрівання селеном із розрахунку 5 г селену на 1 л сірчаної кислоти густиною 1,84. Спокійне кип'ятіння продовжують до повного знебарвлення розчину в колбі. У процесі нагрівання та кип'ятіння кольори рідини змінюється. Приблизно через годину після початку нагрівання вміст коли забарвлюється у стійкий бурий колір; колбу знімають із нагрівального апарата, прохолоджують і вводять по стінці 1–2 краплі пероксиду водню і знову кип'ятять на слабкому вогні до знебарвлення.

За повільного озолення (коли розчин у колбі довго не просвітлюється) виникає необхідність кількаразового додавання по 1–2 краплі пероксиду водню. Тривалість процесу озолення 2,5–5 год.

Озолення закінчують, коли розчин у колбі набуває прозорості, зникає жовто-зелений відтінок і з'являються білі пари оксиду сірки над киплячим розчином золи (*поява білих парів як ознаки повного розкладання пероксиду водню обов'язкова, оскільки пероксид водню заважає визначенню фосфору!*).

Паралельно проводять контрольне озолення реактивів (без рослинного матеріалу), для чого в колбу доливають 5–10 мл сірчаної кислоти густиною 1,84, додають 1–2 мл пероксиду водню (надалі його додають стільки ж, скільки і у колби з рослинною речовиною), вносять селен та озольють так само, як і дослідну речовину. Результати визначення азоту, фосфору, калію та інших елементів у контрольній пробі віднімають зі вмісту відповідних елементів у аналізованому рослинному матеріалі. Отже, виключаються похибки вмісту досліджуваних елементів у рослинах через можливе забруднення застосовуваних під час озолення реактивів.

Після завершення озолення та охолодження колб К'ельдаля в них доливають приблизно по 5 мл дистильованої води та перемішують, уміст колби за таких умов сильно розігрівається. Після охолодження розчин із колби К'ельдаля переносять під час багаторазового ополіскування колби невеликими порціями дистильованої води в мірці колби ємністю 100 мл. Після охолодження мірчих колб і доведення об'єму до мітки дистильованою водою колби закривають пробками та ретельно перемішують. В отриманому розчині визначають азот і зольні елементи відповідними методами.

2. Мокре озолення рослин за методом К. Гінзбурга

Принцип методу. В основу методу покладені реакції гідролізу та окислення органічних речовин рослин сумішшю сірчаної та хлорної кислот (1 : 10) під час нагрівання; основним окисником є хлорна кислота. Безазотисті органічні речовини окислюються до води та вуглекислоти, вивільняючи зольні елементи у вигляді оксидів. Азотвмісні органічні речовини, гідролізуючись та окислюючись до води та вуглекислоти, вивільняють азот у вигляді аміаку, який зв'язується сірчаною кислотою. Отже, у розчині перебувають зольні елементи та азот у формі сірчаноокислого амонію і амонійної солі хлорної кислоти.

Азот визначають мікрометодом К'ельдаля, фосфор – колориметрично, кальцій – на полум'яному спектрофотометрі.

Перебіг аналізу. За допомогою конічної пробірки беруть пробу масою приблизно 0,2 г і переносять у колбу К'ельдаля. Наважку в колбах К'ельдаля заливають сумішшю сірчаної та хлорної кислот (співвідношення 10 : 1) в об'ємі 5,5 мл і ретельно перемішують обережним струшуванням і круговим обертанням умісту колби. Потім колби залишають у штативах для обвуглювання рослинного матеріалу на ніч (мінімальний час обвуглювання 1–1,5 год). Після цього колби установлюють у пристосування для озолення та нагрівають на слабкому вогні до утворення однорідної коричнево-бурої кашки.

Температуру озолення підвищують до слабого кипіння розчину та продовжують озолення до повного знебарвлення, що настає через 25–30 хв. Якщо розчин у колбі продовжує залишатися забарвленим у жовтий або темно-бурий кольори, то додають 1–2 краплі хлорної кислоти і продовжують нагрівання. Не можна створювати великий надлишок хлорної кислоти у колбі, тому що в цьому випадку відбувається втрата азоту. Паралельно проводять контрольне озолення вихідних реактивів без рослинної проби у аналогічному режимі.

Після закінчення озолення колби К'ельдаля охолоджують, потім у них додають по 3–5 мл дистильованої води та після перемішування вмісту знову охолоджують (можна під струменем холодної води). Охолоджений розчин із колби К'ельдаля за допомогою лійки і скляної палички кількісно переносять у мірчу колбу об'ємом 100 мл. Колбу К'ельдаля багаторазово споліскують невеликими

(по 5–10 мл) порціями дистильованої води, зливаючи промивні води в мірчу колбу. Після охолодження об'єм у мірчій колбі доводять дистильованою водою до мітки та після ретельного перемішування приступають до аналізу озолоного зразка.

3. Сухе озолення

Метод сухого озолення застосовується для аналізу вмісту в біологічному матеріалі майже всіх макро- і мікроелементів. Зазвичай сухе озолення рослинних проб проводять у електричній муфельній печі у фарфорових, кварцових або металевих тиглях (або чашках) за температури, що не перевищує 450–500 °С. Найкращими є тиглі із кварцу, однак зазвичай застосовують тиглі з тугоплавкого скла або фарфору. Для деяких спеціальних досліджень можуть знадобитися платинові тиглі. Низька температура під час спалювання та правильний вибір матеріалу тигля дають змогу уникнути втрат від випарювання та через утворення погано розчинних у соляній кислоті окисів певного елемента. Окисли можуть виникати внаслідок реакції з матеріалом, із якого виготовлені тиглі.

Перед озоленням наважку рослинного зразка тонко подрібнюють у звичайному господарському млині із пластику або у ступці (агатовій, фарфоровій), і однорідні проби після висушування за 105 °С зважують у тиглях на аналітичних терезах. Оскільки вміст різних мікроелементів у рослинних тканинах неоднаковий, величина наважки залежить від того, який із мікроелементів передбачається визначити. Для визначення окремих мікроелементів зазвичай беруть такі кількості сухого рослинного матеріалу або відповідні їм кількості свіжого: для Fe – 50–100 мг; Cu – 200–500 мг; Zn – 50–200 мг; Mo – 1–3 г; B – 250–700 мг.

Перш ніж помістити матеріал у муфель, його обвуглюють під інфрачервоним опромінювачем. Якщо для аналізу застосовують сирий матеріал, його обвуглюють за допомогою етилового спирту (ректифікат), який підпалюють, додаючи невеликими порціями (0,5–1 мл) безпосередньо в тигель доти, поки його вміст не перетвориться в однорідну чорну масу. Для повного озолення тигель витримують у муфелі протягом 4–6 год. Велике значення під час сухого озолення відіграє ступінь ущільнення матеріалу, тому важливо вибрати тигель підходящого розміру. Наважка повинна бути насипана на дно пухким шаром, щоб забезпечити доступ кисню до тканин. Тиглі ставлять у холодний муфель, потім закривають дверцята, вмикають муфель та поступово нагрівають. Коли обвуглювання закінчене, дверцята краще відкрити (хоча б на деякий час, щоб збільшити вплив повітря). Спалювання можна прискорити, додаючи в тигель із обвугленим матеріалом речовину, що окислює залишки органіки. Одним із таких окисників може бути концентрована HNO_3 ; 1–2 мл кислоти наливають у тигель, підсушують на плитці (обов'язково під тягою), після чого тигель ще на годину поміщують у муфель.

Для окислення органічних речовин може бути використана також 30 % H_2O_2 . 1–2 мл H_2O_2 додають у тигель і випарюють досуха на водяній бані; якщо в золі ще залишаються чорні крапління, процедуру повторюють. Потім тигель знову прожарюють у муфелі.

За великого вмісту у зразках кремнезему можуть відбутися значні втрати мікроелементів через утворення важкорозчинних сполук. Щоб уникнути цього, золу переносять у платинові тиглі, змочують декількома краплями води, додають краплю концентрованої H_2SO_4 і декілька мілілітрів плавикової кислоти (HF). Далі тиглі ставлять на плитку, поступово нагрівають і випарюють майже досуха. Повністю спалений матеріал (зола) повинен мати рівномірне сірувате (іноді буре) забарвлення, без чорних краплень; не слід також допускати спікання. Після охолодження до золи повільно доливають 5–20 мл 6 н HCl і розчиняють неорганічні солі під час нагрівання на киплячій водяній бані протягом 30 хв. Розчин у тиглі, покритому годинниковим склом, кілька разів обережно перемішують. Потім вміст тигля переносять у центрифугальну пробірку і після центрифугування (1 000–1 500 g) чистий розчин декантують у скляну мірчу колбу із притертою пробкою. Солянокислу витяжку або безпосередньо використовують для визначення мінеральних елементів (В, Мо, Cu, Zn, Mn), або розбавляють у 5–10 разів водою. Зазвичай розведення необхідне під час визначення Р, К, Са, Mg і Fe.

Замість відділення нерозчинного залишку центрифугуванням розчин можна пропустити через фільтр Нуча (№ 4) або паперовий щільний беззолний фільтр. У такому разі фільтрат кількісно переносять у мірчу колбу необхідного об'єму (25–50 мл) і вже розведений розчин безпосередньо використовують для аналізу.

Для розчинення золи замість розведеної HCl часто використовують концентровану HCl (1–2 мл); отриманий розчин після додавання до нього 5–10 мл води фільтрують у мірчу колбу (25–50 мл). Кількісне перенесення витяжки досягається багаторазовим змиванням тигля та фільтра невеликими порціями води, які поєднують із основним фільтратом. Після доведення розчину в колбі водою до міткі його ретельно перемішують. Такий розчин придатний для визначення вмісту у вихідній пробі багатьох мінеральних елементів різними хімічними та фізико-хімічними методами.

РОБОТА 5.1. ВИЗНАЧЕННЯ ЗАГАЛЬНОГО АЗОТУ В НАСІННІ ТА ВЕГЕТАТИВНИХ ОРГАНАХ РОСЛИН (ЗА МЕТОДОМ Х. Н. ПОЧИНКА)

Принцип методу. Органічні речовини спалюються сірчаною кислотою у присутності каталізатора (сульфату міді або молібдату натрію) до діоксиду вуглецю та води. Органічні азотисті речовини перетворюються на аміак, який зв'язується сірчаною кислотою. Надлишок сірчаної кислоти нейтралізується

гідроксидом натрію, і амонійний азот окислюється хлораміном. Надлишок хлораміну визначається йодометричним методом. Йод, який утворюється, титрується тіосульфатом натрію.

Перебіг аналізу. Зважують 0,2 г повітряно-сухого або 1 г сирого подрібненого рослинного матеріалу та висипають його у колбу К'ельдаля об'ємом 30–50 мл. У колбу додають 0,3 мл 10 % розчину молібдату натрію, 4 краплі 30 % пероксиду водню, 0,4 г сульфату калію, 2,5 мл концентрованої сірчаної кислоти, ретельно перемішують і залишають на 2–3 год. Далі колбу ставлять на електричну плитку і нагрівають, регулюючи нагрів так, щоб піна не підіймалася вище припустимого рівня. Коли утворення піни послабне, і в колбі з'являться білі пари сірчаної кислоти, її накривають скляною пробкою або лійкою і продовжують нагрівати до просвітлення розчину (*розчин повинен бути безбарвним та прозорим і не змінювати кольору після охолодження*). Для прискорення спалювання органічних речовин у колбу кожні 15–20 хв додають декілька крапель 30 % пероксиду водню. Після просвітлення розчину та додавання останньої порції пероксиду водню рідину кип'ятять ще 10 хв для повного його розкладення. Після закінчення спалювання колбу охолоджують, і до розчину, який містить концентровану сірчану кислоту, обережно додають 10 мл дистильованої води. Розчин переносять у мірчу колбу об'ємом 50 мл, доводять об'єм водою до мітки і ретельно перемішують.

У розчині, отриманому після спалювання органічних речовин, визначають азот хлорамінним методом. Для цього з дослідного розчину відбирають піпеткою 20 мл під час аналізу коренів, стебел, і 10 мл під час аналізу листя або зерна, переносять у конічну колбу для титрування. Додають 1 краплю 0,1 % розчину метилоранжу і нейтралізують 2 N розчином NaOH до зміни кольору індикатору. Додають 10 мл фосфатного буферного розчину з рН 6,7, який містить бромід калію, перемішують, і по стінці колби вливають 5 мл 0,12 N розчину хлораміну. Колбу закривають пробкою, розчин перемішують круговими рухами і залишають на 25 хв. Після цього додають 2 мл 20 % розчину йодистого калію, 10 мл 8 % розчину шавлевої кислоти і йод, який утворився, титрують 0,02 N розчином тіосульфату натрію у присутності індикатору (0,5 % розчин крохмалю), який додається наприкінці титрування. 1 мл 0,02 N розчину тіосульфату натрію відповідає 0,09338 мг азоту.

Вміст азоту обчислюють за формулою:

$$X = \frac{0,4699 \times K \times (a - b)}{V_2 \times n},$$

де:

X – вміст азоту у перерахунку на абсолютно суху речовину, мг/г;

V₁ – об'єм розчину, в якому розчинена наважка після спалення, мл;

V_2 – об'єм дослідного розчину, який взято для окислення азоту хлораміном, мл;

K – нормальність розчину тіосульфату;

a – об'єм розчину тіосульфату натрію, який витрачено на титрування контрольного зразка, мл;

b – об'єм розчину тіосульфату натрію, який витрачено на титрування дослідного зразка, мл;

n – абсолютно суха наважка (для перерахунку на абсолютно суху речовину необхідно визначити вологість дослідного матеріалу з допомогою висушування за температури 105 °С до постійної ваги), г;

0,4669 – нормальний титр азоту, помножений на 100 для перерахунку у відсотки.

Примітка: Різниця ($a - b$) не повинна перевищувати 22 мл.

Обладнання

1) колби К'єльдаля з пробками; 2) електрична плита; 3) мірчі колби об'ємом 50 мл; 4) бюретки для титрування; 5) піпетки об'ємом 1, 5 та 10 мл; 6) циліндри мірчі; 7) колби для титрування об'ємом 250 мл; 8) сушильна шафа; 9) металеві бюкси.

Реактиви

1) хлорамін 0,12 N розчин; 2) фосфатний буфер з рН 6,7; 3) молібдат натрію (Na_2MoO_4) 10 % розчин; 4) пероксид водню (H_2O_2); 5) сульфат калію (K_2SO_4) безаміачний; 6) сірчана кислота (H_2SO_4) концентрований розчин; 7) гідроксид натрію (NaOH) 2 N розчин; 8) метилоранж 0,1 % розчин; 9) шавлева кислота ($\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$) 8 % розчин; 10) тіосульфат натрію ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 0,02 N розчин (готується з фіксаналу); 11) йодид калію (KI) 20 % розчин; 12) крохмаль 0,5 % розчин.

Приготування реактивів

Реактив № 1 (розчин хлораміну приблизно 0,12 н): 15 г хлораміну Т або 16 г хлораміну В розчиняють у дистильованій воді, розводять до 1 л, ретельно перемішують, фільтрують через ватяний фільтр і зберігають у темній щільно закритій посудині.

Реактив № 2 (фосфатний буфер з рН 6,7): цей розчин можна готувати двома методами:

1. зважують 52,8 г висушеної за температури 105 °С солі KH_2PO_4 та 100 г КВг, розчиняють обидві солі разом у безаміачній воді, додають 80 мл 2 N NaOH , розводять до 1 л безаміачною водою, перемішують і зберігають у щільно закритій посудині;

2. зважують 60 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, висипають у склянку, додають 30 г KH_2PO_4 та 100 г КВг. Розчиняють усі солі в безаміачній воді, доводять об'єм до 1 л, перемішують і зберігають у щільно закритій пляшці.

Реактив № 3 (розчин молібдату натрію): 10 г солі $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ розчиняють у 100 мл дистильованої води і кип'яють протягом 15 хв, далі охолоджують, об'єм розчину доводять до 100 мл безаміачною водою і зберігають у щільно закритій пляшці.

Реактив № 5 (сульфат калію безаміачний): до 200 г сульфату калію х. ч. у склянці об'ємом 2 л додають 1 л дистильованої води і 5 мл 20 % розчину гідроксиду натрію. Суміш нагрівають до кипіння та кип'яють до появи в розчині каламуті від випадіння осаду солі. Розчин переносять у фарфорову чашку і випаровують до невеликого об'єму (приблизно 100 мл), далі рідину охолоджують, прозорий розчин зливають, а залишок висушують на повітряній бані за умови постійного перемішування. Суху сіль висипають у банку і щільно закривають.

Реактив № 8 (розчин метилоранжу 0,1 %). Зважують 100 мг метилоранжу і розчиняють у воді. Об'єм розчину доводять дистильованою водою до 100 мл.

Реактив № 12 (розчин крохмалю). 0,5 г крохмалю розчинного розтирають у ступці з невеликою кількістю гарячої води, суміш переносять у колбу або склянку з гарячою водою і кип'яють протягом 5 хв. Розчин охолоджують, його об'єм доводять до 100 мл. Розчин зберігається протягом 1–2 діб. Для подовження терміну зберігання у розчин крохмалю додають декілька кристалів тимолу.

Безаміачна вода. Дистильовану воду кип'яють протягом 30–40 хв у колбі або склянці. Далі посудину закривають скляною кришкою і воду охолоджують. Зберігають у посудині, щільно закритій пробкою, у яку вставлено трубку Алена, заповнену лугом або аскаритом.

ПИТАННЯ ДЛЯ ПЕРЕВІРКИ ЗНАНЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. До яких речовин входить азот, що визначається цим методом? Що таке «загальний азот»?
2. Яких умов треба дотримуватися під час спалювання матеріалу, щоб уникнути втрат азоту?
3. Які реакції відбуваються під час спалення органічної речовини? У якій формі фіксується азот органічних речовин?
4. Дайте характеристику хлорамінного методу визначення азоту у рослинах.
5. Яка залежність існує між вмістом азоту в рослинному матеріалі і кількістю тіосульфату натрію, що використана для титрування?

РОБОТА 5.2. ВИЗНАЧЕННЯ НІТРАТНОГО АЗОТУ В РОСЛИНАХ ІЗ ДИСУЛЬФОФЕНОЛОВОЮ КИСЛОТОЮ

Принцип методу. Сутність методу полягає в утворенні нітрофенольної сполуки внаслідок реакції між нітратами та дисульфофеноловою кислотою. Нітрофенол, реагуючи з лугом, дає комплексну сполуку жовтого кольору. Між інтен-

сивністю жовтого забарвлення і вмістом нітратів у досліджуваній пробі існує пряма залежність. Метод має високу точність і дає стійкі результати. Однак він вимагає багато часу. Перший етап роботи – підготовка нітратів до забарвлення – займає 99 % усього часу аналізу.

Перебіг аналізу. Середні проби свіжого рослинного матеріалу подрібнюють. Беруть наважку 5–10 г, приміщують у склянку гомогенізатора та додають 25–50 мл дистильованої води і гомогенізують протягом 1 хв за умови 6 тис. об/хв. За умови відсутності гомогенізатора рослинний матеріал розтирають у ступці до однорідної маси. Попереднє додавання у ступку з аналітичною пробкою рідкого азоту до повного проморожування рослинного матеріалу значно прискорює процес подрібнення.

Гомогенізований рослинний матеріал кількісно переносять на фільтр і фільтрують у мірчу колбу об'ємом 100 або 200 мл. Залишки рослинного матеріалу зі стінок гомогенізатора або ступки змивають невеликими порціями дистильованої води та переносять на фільтр. Речовину на фільтрі кілька разів промивають невеликими порціями дистильованої води. Потім об'єм фільтрату доводять дистильованою водою до мітки, закривають пробкою та перемішують. Після цього піпеткою беруть 50 мл фільтрату, поміщають у порцелянову чашку, додають 1–2 мл пероксиду водню і випарюють уміст порцелянної чашки на киплячій водянній бані майже досуха.

У чашку вливають 10–20 мл концентрованого пероксиду водню, змочують ним стінки фарфорової чашки для розчинення осаду жовто-бурих кольорів, чашку закривають годинниковим або звичайним склом, установлюють на киплячу водяну баню та витримують до повного руйнування органічних сполук перексидом водню. Періодично додають перексид водню по 5–10 мл, також змочуючи ним стінки чашки після повного випарювання попередньої порції.

Завершують термічну обробку фільтрату лише після повного руйнування та окислення органічних речовин. Установлюють цей факт за абсолютно білим кольором сухого осаду солей на дні чашки і відсутності жовтуватих слідів, що залишають органічні сполуки, які не розклалися. Не повністю окиснені залишки органічних сполук заважають визначенню через обвуглювання під час взаємодії їх із дисульфогеноловою кислотою.

У чашку із сухим білим осадом солей доливають 1 мл дисульфогенолової кислоти та скляною паличкою розподіляють її тонким шаром по всій внутрішній поверхні чашки, одночасно розчиняючи осад солей. Через 10 хв у чашку доливають 10 мл дистильованої води і нейтралізують її вміст 10 % розчином лугу (NaOH).

У присутності нітратів у дослідному розчині з'являється жовте забарвлення. Забарвлені розчини через лійку переносять у мірчі колби місткістю 100 мл, багаторазово споліскуючи дистильованою водою чашку та скляну паличку, до-

водять об'єм до мітки, закривають пробками і перемішують. Оптичну густину розчинів вимірюють на фотоелектроколориметрі проти синього світлофільтра (довжина хвилі 400 нм) у кюветах товщиною 2 см.

Вміст нітратів розраховують за формулою:

$$X = \frac{C \times V \times 100}{n \times V_1},$$

де:

X – кількість нітратів у рослинному матеріалі, мг/100 г;

C – кількість нітратів за графіком, мг/100 мл;

n – наважка аналізованої речовини, г;

V – об'єм фільтрату, мл;

V_1 – об'єм фільтрату для випарювання, мл.

Побудова калібрувального графіка

Для побудови калібрувальної кривої у пронумеровані фарфорові чашки беруть 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 і 50 мл зразкового розчину нітрату з вмістом NO_3 0,01 мг/мл. Отже, у відповідні чашки внесено 0,01; 0,05; 0,1; 0,15; 0,20; 0,25; 0,30; 0,40; 0,50 мг нітрату. Чашки встановлюють на киплячу водяну баню та випарюють уміст досуха. Потім у сухі чашки з осадом нітрату калію доливають по 1 мл дисульфофенолової кислоти, змочують усю внутрішню поверхню чашки з осадом і через 10 хв доливають по 10 мл дистильованої води та нейтралізують 10 % розчином NaOH до появи стійкого жовтого забарвлення.

Забарвлені розчини калібрувального графіка переносять у пронумеровані мірчі колби місткістю 100 мл, багаторазово змиваючи водою вміст чашок у відповідні мірчі колби. Далі об'єми в колбах доводять дистильованою водою до міток, закривають пробками, перемішують і вимірюють оптичну густину кожного розчину, починаючи з найменшої концентрації, на фотоелектроколориметрі за довжини хвилі 400 нм (синій світлофільтр).

На міліметровому папері будують калібрувальну криву, відкладаючи на осі ординат значення оптичної густини, а на осі абсцис – відповідні концентрації нітратів (у мг на 100 мл забарвленого розчину).

Обладнання

1) гомогенізатор або фарфорова ступка; 2) фарфорові чашки; 3) мірчі колби місткістю 1 л та 100 мл; 4) фотоелектроколориметр або спектрофотометр; 5) аналітичні терези.

Реактиви

1) дисульфофенолова кислота; 2) гідроксид натрію (NaOH) 10 % розчин; 3) нітрат калію (KNO_3) зразковий розчин.

Приготування реактивів

Реактив № 1 (дисульфогенолова кислота). 3 г чистого, свіжоперегнаного фенолу змішують із 37 г (20,1 мл) х. ч. сірчаної кислоти густиною 1,84, приміщують у круглодонну колбу відповідного об'єму, закривають пробкою з довгою трубкою (зворотний холодильник) та нагрівають на киплячій водяній бані протягом 6 год.

Реактив № 3 (стандартний розчин нітрату). Зважують на аналітичних терезах 0,1631 г х. ч. KNO_3 приміщують у літрову колбу, розчиняють у дистильованій воді, доводять до мітки та перемішують. Беруть 100 мл цього розчину, переносять у мірчу колбу місткістю 1 л і доводять дистильованою водою до мітки. У приготованому останньому розчині міститься NO_3^- у концентрації 0,01 мг/мл (зразковий розчин).

ПИТАННЯ ДЛЯ ПЕРЕВІРКИ ЗНАНЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Яке значення має азот у життєдіяльності рослин?
2. У яких формах азот поглинається рослинами?
3. Яких перетворень зазнають нітрати у рослинах?
4. Дайте характеристику принципу методу визначення нітратів із дисульфогеноловою кислотою.
5. Як буде утворюватися калібрувальний графік для визначення нітратів за допомогою дисульфогенолової кислоти?

РОБОТА 5.3. ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ НІТРАТІВ У РОСЛИНАХ ЗА ДОПОМОГОЮ ІОНСЕЛЕКТИВНОГО ЕЛЕКТРОДА

Принцип методу. В основу методу покладено явище виникнення електричного заряду певної величини практично всіх іонів, розчинених у воді, або слабких розчинах нейтральних солей. Електрорушійна сила (ЕРС) розчину, обумовлена нітратами, селективно вимірюється нітратним електродом. Конструктивно та технологічно цей електрод виконаний так, що здатний реєструвати лише електричні заряди нітратів-іонів. Між ЕРС, вимірюваною електродом, та концентрацією нітратів у розчині існує пряма залежність. У цьому разі нітрати визначають потенціометрично за допомогою іонселективного електрода у витяжці зі свіжого рослинного матеріалу. Як екстрагуючий розчин використовують 1 % розчин алюмокалієвих квасців. Під час визначення нітратів у витяжці іонселективним електродом як допоміжний електрод застосовують хлорсрібний електрод. Визначення ведуть на іономірі ЕВ-74 або аналогічному приладі іншої конструкції.

Перебіг аналізу. Свіжий рослинний матеріал (стебла та листи злакових і бобових трав, бадилля рослини силосних культур, качани капусти, листові овочі тощо) подрібнюють ножицями або ножем на дерев'яній дошці та ретельно пере-

мішують. Плоди, корені і бульби подрібнюють на терці або м'ясорубці і також ретельно перемішують. За допомогою тарованої фарфорової чашки на технічних терезах відважують 12,5 г попередньо подрібненого рослинного матеріалу та при-мішують у склянку гомогенізатора. Залишки рослинної речовини з фарфорової чашки змивають у склянку місткістю 50 мл 1 % розчину алюмокалієвих квасців і гомогенізують протягом 2 хв за умови 6 000 об/хв.

Після гомогенізації суспензію переливають у хімічну склянку місткістю приблизно 100 мл. За умови відсутності гомогенізатора наважку попередньо по-дрібненого рослинного матеріалу розтирають у ступці із кварцовим піском до однорідної маси. Попередньо пісок промивають у соляній кислоті та ретельно відмивають від хлорид-іонів водопровідною і дистильованою водою та після ви-сушування на повітрі прожарюють у муфелі за температури 250 °С.

Уміст ступки заливають 10–20 мл 1 % розчину алюмокалієвих квасців і продовжують розтирати протягом 3–5 хв, а потім масу кількісно переносять у хімічну склянку місткістю приблизно 100 мл, змиваючи залишки на ступці та товкачику розчином алюмокалієвих квасців (загальний об'єм розчину солі по-винен становити 50 мл). Перенесену масу енергійно перемішують у склянці скля-ною паличкою протягом 2–3 хв. У підготованих гомогенатах вимірюють потен-ціал нітратного іонселективного електрода на іономірі.

Концентрацію нітратів у досліджуваному розчині знаходять за графіком на підставі вимірюного потенціалу у мВ. Для побудови калібрувального графіка ви-мірюють ЕРС у мілівольтах у серії розчинів нітрату калію відомої концентрації – 0,1; 0,01; 0,001 і 0,0001 М. За отриманим значенням для розчинів зазначеної кон-центрації будують калібрувальний графік, відкладаючи на осі абсцис значення pNO_3 , а на осі ординат – відповідні їм значення ЕРС (мВ).

Вміст азоту нітратів у рослинному матеріалі (у мг/кг сирової маси) обчислю-ють за формулою

$$X = \frac{10^{-pX} \times A \times V \times 10^3}{n},$$

де:

X – вміст нітратів, мг/кг;

p – негативний логарифм концентрації нітратного азоту ($-\log C_N - \text{NO}_3$) за графіком;

A – атомна маса елемента, г;

V – об'єм витяжки, мл;

n – маса наважка аналізованого матеріалу, г;

10^3 – коефіцієнт переведу у мг.

Обладнання

1) гомогенізатор або фарфорова ступка; 2) фарфорові чашки; 3) хімічні склянки місткістю 100 мл; 4) мірчі колби місткістю 1 л; 5) терки; 6) ножі; 7) кю-

вети; 8) шпатель; 9) аналітичні терези; 10) іономір; 11) нітратний іонселективний електрод.

Реактиви

1) алюмокалієві квасці ($\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 1 % розчин; 2) нітрат калію (KNO_3) 0,1 М стандартний розчин.

Приготування реактивів

Реактив № 2. 10,11 г х. ч. перекристалізованого та висушеного за температури 100–105 °С до постійної маси нітрату калію розчиняють у 1 % розчині алюмокалієвих квасців у мірчій колбі місткістю 1 л і доводять цим самим розчином до мітки.

ПИТАННЯ ДЛЯ ПЕРЕВІРКИ ЗНАНЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Наведіть принцип методу визначення нітратів за допомогою іон-селективних електродів.
2. Охарактеризуйте порядок виконання роботи.
3. Як і для чого будується калібрувальний графік?

РОБОТА 5.4. ВИЗНАЧЕННЯ АМОНІЙНОГО АЗОТУ ЗА МЕТОДОМ КОНВЕЯ

Принцип методу. Амонійний азот у рослинних тканинах може бути визначений мікродифузійним методом. Метод оснований на поглинанні у замкненому просторі аміаку, який виділяється з досліджуваної витяжки за умови дії на неї лугу, титрованим розчином кислоти. Залишок кислоти, який не прореагував з аміаком, титрують розчином лугу.



Рис. 22. Чашка Конвея

Реакцію проводять у спеціальних скляних чашках із пришліфованими скляними пластинками (чашки Конвея). Чашка Конвея складається з двох відділень, відокремлених перегородкою – зовнішнього та внутрішнього (рис. 22). Перегородка не доходить до шліфованої пластинки, яка слугує кришкою.

Перебіг аналізу. Наважку рослинного матеріалу розтирають у фарфоровій ступці з водою, кількісно переносять у центрифугувальну пробірку, до гомогенату у пробірці додають рівний об'єм 10 % трихлороцтової кислоти для осадження білка. Білок відокремлюють центрифугуванням за умови 5 тис. об/хв протягом 10–15 хв. Для визначення амі-

ачного азоту використовують центрифугат, 5–10 мл якого наливають у зовнішнє відділення чашки Конвея, додаючи декілька крапель змішаного індикатора, який забарвлює рідину у червоний колір. Рідина не повинна вкривати всю поверхню дна цього відділення. У внутрішнє відділення за допомогою мікробюретки наливають 1 мл 0,01 н титрованого розчину H_2SO_4 . Шліфовані краї чашки змащують вазеліном та насувають скляну пластинку так, щоб по краю чашки утворилося «дзеркало», але залишають вузьку щілину, достатню для введення кінчика піпетки. Через цю щілину піпеткою вносять 1 мл насиченого розчину K_2CO_3 і швидко насувають кришку на щілину. Бажано, щоб до цього досліджуваній розчин та розчин карбонату калію не змішалися. Круговими рухами повертають чашку для перемішування кислоти витяжки та розчину K_2CO_3 , після чого вміст зовнішнього відділення набуває зеленого забарвлення.

Чашки обережно приміщують до термостата на 1,5–2 год за температури 35–40 °С, для того щоб аміак повністю витіснити лугом із розчину та забезпечити його кількісне поглинання кислотою. Далі чашки Конвея відкривають та у внутрішнє відділення додають краплю змішаного індикатора, який забарвлює рідину у рожевий колір. Невикористану кислоту у чашці титрують із мікробюретки 0,01 н титрованим розчином NaOH до переходу забарвлення від фіолетового до яскраво-зеленого.

Обчислення вмісту амонійного азоту ведуть за формулою:

$$X = \frac{a \times T \times 0,14 \times 100}{n},$$

де:

X – вміст амонійного азоту, %;

a – кількість 0,01 н H_2SO_4 , використаної на зв'язування аміаку, мл;

T – поправка до титру 0,01 н H_2SO_4 ;

0,14 – кількість амонійного азоту, яка відповідає 1 мл 0,01 н H_2SO_4 , використаної на зв'язування аміаку;

100 – коефіцієнт перерахунку у відсотки;

n – наважка рослинного матеріалу, яка міститься у об'ємі розчину, взятого для визначення.

Обладнання

1) чашки Конвея; 2) фарфорові ступки з товчачиками; 3) піпетки; 4) мікробюретки.

Реактиви

1) сірчана кислота (H_2SO_4) 0,01 N розчин (отримують шляхом розведення 0,1 N розчину, який готують із фіксаналу); 2) гідроксид натрію (NaOH) 0,01 N розчин; 3) карбонат калію (K_2CO_3) насичений розчин; 4) комбінований індикатор.

Приготування реактивів

Реактив № 4 (комбінований індикатор). Для приготування запасного розчину комбінованого індикатору змішують 0,1 % спиртові розчини метилового червоного та метиленового синього у співвідношенні 4:5. Перед застосуванням до 1 мл такого розчину доливають 1 мл етилового спирту і 2 мл води. Отриманий розчин нейтралізують 0,1 н NaOH до появи коричнево-фіолетового забарвлення.

ПИТАННЯ ДЛЯ ПЕРЕВІРКИ ЗНАНЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Яке значення має амонійний азот для рослин? Які форми азоту містяться у рослинах та які шляхи їх перетворень Ви знаєте?
2. Наведіть принцип методу визначення амонійного азоту.
3. Яка послідовність виконання аналізу? Яких заходів потрібно дотримуватися, щоб уникнути втрат амонійного азоту?

РОБОТА 5.5. ВИЗНАЧЕННЯ ФОСФОРУ ЗА «СИНІМ» ФОСФОРНОМОЛІБДЕНОВИМ КОМПЛЕКСОМ ЗА МЕТОДОМ ЛОУРІ ТА ЛОПЕСА

Принцип методу. У цьому варіанті методу вміст неорганічного фосфору у розчині визначають за інтенсивністю синього забарвлення відновленого фосфорномолібденового комплексу. Останній утворюється у кислому середовищі (рН 4) з фосфорної та молібденової кислот у присутності аскорбінової кислоти. Оптична густина забарвлених розчинів пропорційна концентрації іонів PO_4^{3-} .

Перебіг аналізу. Для визначення фосфору беруть 2 мл досліджуваного розчину або екстракту, додають до нього 2 мл ацетату натрію, 4 мл ацетатного буфера (рН 4) та 1 мл аскорбінової кислоти. У суміш через 10 хв вносять 1 мл молібдату амонію і через 10 хв вимірюють оптичну густина на фотоелектроколориметрі (червоний світлофільтр, товщина кювети – 5 мм) або спектрофотометрі (кювети – 10 мм). Під час змішування розчинів слід обов'язково дотримуватися зазначеного порядку.

Побудова калібрувального графіка

Для побудови каліброваного графіка використовують два зразкові розчини: І (запасний) і ІІ (робочий). Розчин І містить 250 мг фосфору 1 л (500 мкг у 2 мл). Для одержання розчину ІІ розбавляють розчин І у 10 разів. У 2 мл його міститься 50 мкг фосфору (25 мкг/мл). Робочий розчин використовують для приготування стандартів (кількість фосфору у 2 мл змінюється від 5 до 30 мкг).

Обладнання

1) пробірки; 2) фотоелектроколориметр або спектрофотометр та кювети до них; 3) мірча колба місткістю 1 л.

Реактиви

1) ацетат натрію (CH_3COONa) 1 М розчин; 2) молібдат амонію (Na_2MoO_4) 1 % розчин у 0,05 N H_2SO_4 ; 3) ацетатний буфер (pH 4); 4) зразковий розчин фосфору.

Приготування реактивів

Реактив № 3 (ацетатний буфер pH 4). Готують 0,25 М CH_3COONa та 1 н CH_3COOH (льодяна оцтова кислота густиною 1,052). Далі змішують отримані розчини у співвідношенні 1 : 5.

Реактив № 4. Для приготування запасного зразкового розчину зважують 0,870 г перекристалізованого монофосфату калію (KH_2PO_4), розчиняють його у дистильованій воді та доводять об'єм розчину у мірчій колбі дистильованою водою до 1 л. Робочий розчин готують шляхом розведення запасного розчину дистильованою водою у 10 разів.

ПИТАННЯ ДЛЯ ПЕРЕВІРКИ ЗНАНЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Яке значення має фосфор у життєдіяльності рослин?
2. У якій формі фосфор входить до складу рослинних організмів?
3. Наведіть принцип методу визначення фосфору. Які реакції протікають під час аналізу?
4. Наведіть правила роботи з фотоелектроколориметром та спектрофотометром.

РОБОТА 5.6. ВИЗНАЧЕННЯ ФОСФОРУ ЗА УТВОРЕННЯМ «ЖОВТОГО» ФОСФОРНОМОЛІБДЕНОВОГО КОМПЛЕКСУ ЗА МЕТОДОМ БЕРНАРДА

Принцип методу. У цій модифікації фотометричного методу визначення ортофосфату використовують 4 % розчин молібденової кислоти, а як розчинник – ацетон або його водний розчин. Метод зручний для визначення вільного ортофосфату у неорганічних або органічних фосфорних сполуках, а також загального вмісту P_2O_5 у біологічних об'єктах після їх мінералізації. Використання ацетону, який добре розчиняє водонерозчинні алкілфосфати, дає змогу виміряти вміст незв'язаної фосфорної кислоти у різних органічних сполуках; цей розчинник підсилює також інтенсивність жовтого забарвлення та прискорює його розвиток. Забарвлення з'являється майже миттєво і стійке протягом 5 год. Цим методом можна виявити від 0,0025 до 3,00 мг P_2O_5 .

Вимірювання проводять в ультрафіолетовій області спектра. Оптична густина розчину, який містить окислений комплекс, пропорційна концентрації іону PO_4^{3-} . Лінійна залежність між кількістю ортофосфату у пробі та оптичною гус-

тиною розчину (340 нм) зберігається за вмісту P_2O_5 у пробі від 0 до 3 мг (довжина оптичного шляху 10 мм).

Перебіг аналізу. Для визначення вмісту загального фосфору наважку рослинного матеріалу (0,5 г) спалюють у колбі К'єльдаля з 10 мл $HClO_4$ або з 2 мл H_2SO_4 з додаванням H_2O_2 . Після мінералізації безбарвний охолоджений розчин доводять у мірчій колбі водою до потрібного об'єму. Для аналізу органічних фосфатів у випадках, коли фосфор зв'язаний із карбоном через кисень, наважку 0,5 г спалюють у суміші з 25 мл HNO_3 та 10 мл $HClO_4$. Після мінералізації вміст колби охолоджують, переносять у мірчу колбу потрібного об'єму і доводять водою до мітки. Беруть аликвотну частину (вміст P_2O_5 1,2–2,5 мг) у мірчу колбу на 50 мл, додають 10 мл молібденовокислого амонію, 25 мл ацетону та доводять водою до мітки. Розчин ретельно перемішують та вимірюють його оптичну густину на спектрофотометрі за 340 нм проти води. Одночасно проводять визначення оптичної густини контрольного розчину (без витяжки рослинного матеріалу). Розрахунок ведуть за калібрувальним графіком, для побудови якого використовують серію стандартних розчинів, приготованих із розчину 2.

Для визначення вільної фосфорної кислоти у алкілфосфатах 1 г зразку розчиняють у ацетоні та доводять об'єм розчину ацетоном до 100 мл. Далі 5 мл розчину переносять у мірчу колбу об'ємом 25 мл, додають 2 мл розчину молібдату амонію та доводять ацетоном до мітки. Оптичну густину ретельно перемішаного розчину вимірюють на спектрофотометрі за довжини хвилі 340 нм проти ацетону; паралельно вимірюють оптичну густину контрольного розчину (2 мл молібдату амонію + 23 мл ацетону). Серію стандартних розчинів для побудови калібрувального графіка готують із реактиву № 2, розведеного у 10 разів. Цей розчин містить 0,1 мг P_2O_5 у 1 мл.

Обладнання

1) мірчі колби об'ємом 25 та 100 мл; 2) мірчі піпетки; 3) спектрофотометр; 4) колби К'єльдаля.

Реактиви

1) молібдат амонію $((NH_4)_2MoO_4)$ 4 % розчин; 2) фосфат калію однозаміщеного (KH_2PO_4) стандартний розчин; 3) сірчана кислота (H_2SO_4) ; 4) пероксид водню (H_2O_2) ; 5) хлорна кислота $(HClO_4)$; 6) азотна кислота (HNO_3) ; 7) ацетон.

Приготування реактивів

Реактив № 1. Розчиняють 18,8 г хімічно чистого молібдату амонію $((NH_4)_2MoO_4)$ у 300 мл води; додають 150 мл 98 % H_2SO_4 , обережно охолоджують та доводять об'єм розчину дистильованою водою до 500 мл.

Реактив № 2 (стандартний розчин фосфору). Розчиняють 1,9157 г KH_2PO_4 в колбі об'ємом 1 л та доводять водою до мітки; сіль попередньо висушують протягом 1 год за 105 °С. 1 мл розчину містить 1,0 мг P_2O_5 .

ПИТАННЯ ДЛЯ ПЕРЕВІРКИ ЗНАЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Охарактеризуйте принцип методу. Чим запропонований метод відрізняється від попереднього?
2. Як за допомогою цього методу можна визначити окремі фракції фосфору у рослинному матеріалі?
3. Який розчин у цій роботі називають контрольним? Для чого він потрібний?
4. Як можна обчислити концентрацію та вміст фосфатів у розчині? Охарактеризуйте відповідні формули.

РОБОТА 5.7. ВИЗНАЧЕННЯ ФОСФОРУ ЗА МЕТОДОМ КОНДРАШОВОЇ

Принцип методу. Метод дає змогу визначати фосфор у складі невідновленого фосфорномолібденового комплексу (ФМК) без попереднього відділення його від надлишку молібдату амонію. Це досягається шляхом вимірювання оптичної густини розчину, що містить жовтий ФМК, у присутності дегідратуючих речовин, зокрема 96 % етанолу. У спиртовому середовищі спостерігається значна розбіжність у спектрах поглинання ФМК та молібдату амонію. Найбільше ця різниця помітна під час вимірювання оптичної густини за довжини хвилі 390 нм.

Превага методу – скорочення часу контакту дослідної проби з молібдатом амонію у кислому середовищі, що попереджає гідроліз лабільних фосфорних сполук, зростає стабільність забарвлення і абсолютна чутливість визначення та досягається більш висока верхня межа вимірювання через усунення впливу важко-контрольованих чинників на розвиток забарвлення.

Перебіг аналізу. Для проведення аналізу у пробірку вносять 3 мл етанолу, 0,1 мл витяжки рослинного матеріалу, спаленого за методом мокрого озолення з HClO_4 та HNO_3 , 0,4 мл 10 % молібдату амонію, приготованого на 8 н H_2SO_4 . Потрібно обов'язково дотримуватися послідовності додавання реактивів. Молібдат амонію вносять безпосередньо перед вимірюванням оптичної густини. Фотометрують за довжини хвилі 390 нм проти спирту. Забарвлення зберігається стабільно протягом декількох годин.

Побудова калібрувального графіка

Калібрувальний графік будують із перекристалізованою K_2HPO_4 . Серію зразкових розчинів, які містять 0,2–2,5 мкг-атомів фосфору у пробі (0,1 мл), готують, додаючи розчин неорганічного фосфату до розчину молібдату амонію. Оптичну густину отриманих зразків вимірюють на спектрофотометрі за довжини хвилі 390 нм. Для побудови графіка на осі абсцис відкладають концентрацію фосфату, а на осі ординат – оптичну густину.

Обладнання

1) колби К'ельдаля для мокрого озолення об'ємом 25–50 мл; 2) пробірки; 3) мірчі піпетки; 4) спектрофотометр.

Реактиви

1) хлорна кислота (HClO_4) концентрована; 2) азотна кислота (HNO_3) концентрована; 3) молібдат амонію ($(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$) 10 % розчин; 4) фосфат калію однозаміщений (KH_2PO_4) стандартний розчин; 5) етанол ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) 96 %.

Приготування реактивів

Реактив № 3. Для отримання аналітично чистого молібдату амонію сіль перекристалізують із водно-аміачного середовища. Для цього 50 г молібденовокислого амонію розчиняють у бідистильованій воді (~70 мл), швидко фільтрують у фарфорову чашку та додають до фільтрату приблизно 30 крапель аміаку (крапля – до появи запаху аміаку). Далі розчин упарюють на водяній бані до появи на поверхні розчину тонкої плівки кристалів. Через добу випарюють повністю воду з розчину, а осад солі відокремлюють на лійці Бюхнера та сушать за 60 °С. Отриманий молібдат амонію використовують для приготування 10 % розчину (10 г солі та 90 г бідистильованої води).

Реактив № 4. Для перекристалізації KH_2PO_4 хімічно чисту сіль промивають етанолом (для видалення домішки K_2HPO_4). 100 г фосфату калію розчиняють у гарячій бідистильованій воді (190 мл). Далі розчин фільтрують через лійку для гарячого фільтрування. Після охолодження осад відфільтровують на лійці Бюхнера та сушать за температури 105 °С.

ПИТАННЯ ДЛЯ ПЕРЕВІРКИ ЗНАЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Охарактеризуйте принцип методу. Чим запропонований метод відрізняється від попередніх?
2. Які особливості методу дають змогу проводити аналіз, незважаючи на присутність молібдату амонію?
3. Як провести очищення та перекристалізацію молібдату амонію?
4. Як провести очищення та перекристалізацію фосфату калію однозаміщеного?
5. Як будується калібрувальний графік та обчислюється концентрація і вміст фосфатів у розчині? Охарактеризуйте відповідні формули.

РОБОТА 5.8. ВИЗНАЧЕННЯ СІРКИ У РОСЛИННОМУ МАТЕРІАЛІ

Принцип методу. Існує декілька способів визначення вмісту сірки у рослинному матеріалі, які ґрунтуються на її переведенні у сульфат-іон.

Перебіг аналізу. Для мінералізації сірки у рослинних об'єктах найчастіше використовують скляну колбу місткістю 250–600 мл, у яку приміщують наважку

рослинного матеріалу зі вмістом сірки від 4 до 30 мкг у пробі. Для фіксації проби застосовують спіральний кошик із платинового або ніхромового дроту (діаметр 0,5–0,9 мм), який підвішують на гачок пробки. Найкраще з цією метою використовувати спеціальну скляну (із шліфом) пробку, нижня частина якої відтягнута та закінчується гачком. Наважку перед спаленням загортають у беззольний фільтр так, щоб один із його кінців залишався вільним. Загорнутий рослинний матеріал примішують до кошика.

Колбу, що містить 10 мл 3 % H_2O_2 або 10 % HClO_4 наповнюють киснем, пропускаючи його 2–3 хв з балону або кисневої подушки. Далі вільний кінчик фільтра підпалюють, а пробку с кошиком та пробкою швидко вставляють у колбу. Шліф пробки змочують невеликою кількістю води. Під час спалювання пробку потрібно притримувати. Через 30 хв, після повного зникнення парів у колбі, пробку відкривають та обережно змивають шліф і кошик водою, вміст колби упарюють на пічці до об'єму 10 мл. Визначення кількості сірки у спаленому матеріалі можливе декількома методами.

Визначення сульфат-іону у присутності нітхромазо. Для титрування SO_4^{2-} сіллю барію необхідне 40–50 % водноорганічне середовище. За цих умов розчин нітхромазо фіолетового кольору, розчин його комплексу з барієм – блакитного. Індикатор реагує з іонами барію в кислому середовищі за рН 1,7–2,0.

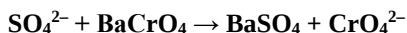
До розчину в колбі (~10 мл) додають 1 мл 0,1 М HCl , рівний об'єм ацетону або етанолу, та титрують 0,02 М або 0,04 М хлоридом барію у присутності 1–2 крапель 0,2 % водного розчину індикатору нітхромазо до переходу фіолетового забарвлення у блакитне.

Використання як індикатору нітхромазо дає змогу визначити сірку у присутності галоїдів, К, Са, Mg та фосфору. Помилка визначення становить $\pm 0,05$ % за вмісту сірки 0,5–2 %.

Чутливість визначення сульфатів прямим титруванням у присутності нітхромазо можна підвищити за умови фіксації точки еквівалентності фотометричним способом. Для цього в якості титранту використовують $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ у диметилформаміді. Оптичну густину вимірюють за 646–650 нм.

Визначення сірки хроматометричним методом. Після закінчення спалення рослинної наважки розчин із колби кількісно переносять у мірчу колбу (25–50 мл) за допомогою дистильованої води, нейтралізують аміаком (як індикатор використовують конго червоний) та доводять до мітки.

Вміст іонів SO_4^{2-} у розчині визначають за інтенсивністю фіолетового забарвлення сполуки, що утворюється хромат-іоном та дифенілкарбазидом. Інтенсивність забарвлення пропорційна вмісту у розчині іону CrO_4^{2-} , який утворюється як продукт реакції:



у кількості, еквівалентній вмісту іону SO_4^{2-} . Реакція проходить у кислому середовищі.

Аліквотну частину розчину з колби переносять у мірчі пробірки (12–15 мл), додають 3 мл 0,005 М розчину BaCrO_4 та витримують 15 хв для повного осадження BaSO_4 ; надлишок BaCrO_4 осаджують додаванням 1 мл прозорого аміачного розчину $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Далі об'єм розчину у пробірках доводять до 20 мл, вміст перемішують та центрифугують протягом 5 хв за 3000 g; 1 мл прозорої рідини обережно переносять у колбу на 25 мл, додають 1 мл 1 % розчину дифенілкарбазиду і доводять до мітки 1 N H_2SO_4 . Через 5 хв визначають оптичну густину розчину на фотоелектроколориметрі (зелений світлофільтр, кювета 10 мм) або спектрофотометрі за довжини хвилі 545 нм. Забарвлення стабільне протягом 4 год.

Якщо зразок містить фосфати, то у присутності хромату барію одночасно будуть осаджуватись і фосфати, і сульфати. Внаслідок цього у середовищі з'являться додаткові кількості іонів CrO_4^{2-} , що призведе до похибки аналізу на вміст сірки. Для запобігання похибки фосфор перед визначенням сірки осаджують CaCl_2 . Для цього у центрифугальні пробірки з дослідним розчином додають 2 мл 0,4 % CaCl_2 та 2 мл 1 N розчину NH_4OH для створення лужного середовища, об'єм доводять до 10 мл дистильованою водою. Далі розчин центрифугують 5 хв за 3 000 g, відбирають із надосадової рідини аліквотну частину, нейтралізують (за потреби) розрахованою кількістю HCl та визначають вміст сірки за зазначеною вище методикою.

Вміст сірки у дослідних розчинах визначають за калібрувальним графіком, для чого використовують серію стандартних розчинів K_2SO_4 , які містять від 2 до 40 мкг сірки у пробі (25 мл). Стандартні розчини готують із вихідного розчину хімічно чистого K_2SO_4 , висушеного за 105 °С, що містить 50 мг S у 1 л. Розраховану кількість вихідного розчину вносять у центрифугальні пробірки і далі поступають так само, як і під час визначення сірки у дослідних розчинах.

Цим методом можна визначити 8 мкг сірки в об'ємі 6 мл (кювета 10 мм).

Обладнання

1) колби об'ємом 250–600 мл, обладнані пробками та ніхромовими спіралями для фіксації наважок; 2) колби для титрування об'ємом 50 мл; 3) центрифугальні пробірки; 4) мірчі пробірки; 5) мірчі піпетки; 6) центрифуга; 7) спектрофотометр або фотоелектроколориметр; 8) бюретки для титрування; 9) беззолні фільтри.

Реактиви

1) пероксид водню (H_2O_2) 3 %; 2) хлорна кислота (HClO_4) концентрована; 3) соляна кислота (HCl) 1 М; 4) ацетон або етанол концентровані; 5) хлорид барію (BaCl_2) 0,02 або 0,04 М; 6) нітхромазо 0,2 %; 7) гідроксид барію ($\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)

0,02 М; 8) хромат барію (BaCrO_4) 0,005 М; 9) гідроксид кальцію ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) аміачний розчин; 10) дифенілкарбазид 1 %; 11) сірчана кислота (H_2SO_4) 1 N; 12) хлорид кальцію (CaCl_2) 0,4 %; 13) аміак (NH_4OH) 1 N; 14) сульфат калію (K_2SO_4) хімічно чистий, безводний.

Приготування реактивів

Реактив № 8. Для отримання хромату барію (BaCrO_4) 300 мл розчину ацетату барію ($\text{Ba}(\text{CH}_3\text{COO})_2$) (26 г в 300 мл H_2O) підкислюють оцтовою кислотою до pH 5, доводять до кипіння та доливають 300 мл гарячого розчину (80 °C) хромату амонію (10 г розчиняють у цьому об'ємі). Далі охолоджений розчин фільтрують через щільний фільтр, а жовтий осад промивають дистильованою водою до ледве помітного у промивних водах в присутності нітрату срібла (0,5 N AgNO_3) червоно-коричневого забарвлення. Осад підсушують, відокремлюють від фільтра та сушать за 120 °C. Зберігають у щільно закритій банці. Реактив для аналізу готують з 1,267 г BaCrO_4 , який розчиняють у 100 мл 1 N HCl та доводять об'єм водою до 1 л.

Реактив № 9. Розчин гідроксиду кальцію готують з оксиду кальцію (CaO), отриманого шляхом прокалювання оксалату кальція за 1 000 °C протягом 2 год. 0,25 г CaO розчиняють у 100 мл 5 N аміаку (NH_4OH), добре збовтують та відстоюють. Необхідну кількість прозорого розчину використовують для осадження надлишку хромату барію.

Реактив № 10. 1 % розчин 1,5-дифенілкарбазиду готують у день використання розчиненням наважки у 96 % етанолі за нагрівання на водяній бані зі зворотним холодильником. Після повного розчинення та охолодження розчин доводять етанолом до потрібного об'єму.

ПИТАННЯ ДЛЯ ПЕРЕВІРКИ ЗНАТЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Яке значення має сірка у життєдіяльності рослин?
2. Наведіть основні сполуки рослинних організмів, що містять сірку.
3. Наведіть принцип методу підготовки рослинного матеріалу до визначення.
4. Дайте характеристику методу визначення сірки у присутності нітхромазо.
5. Наведіть характеристику методу визначення сірки хроматометричним методом.
6. Порівняйте наведені методи визначення сірки. Охарактеризуйте їх переваги та недоліки.

РОБОТА 5.9. ВИЗНАЧЕННЯ СІРКИ У ВИГЛЯДІ S^{2-} ПІСЛЯ ВІДНОВНОЇ ГІДРОГЕНІЗАЦІЇ

Принцип методу. Якщо розкладання органічної речовини ведеться за допомогою методів, що викликають утворення H_2S , то використовується йодомет-

ричне титрування розчином о-оксимеркуробензойної кислоти або фотометрично за допомогою метиленового блакитного.

Перебіг аналізу. Озолення рослинного матеріалу можна проводити двома методами.

Метод 1. Для визначення сірки у формі S^{2-} наважку біологічного матеріалу (~ 10 мг) загортають у паперовий фільтр, приміщують у платиновому кошику у посудину для спалювання, яка містить 10 мл води і 0,25 мл 10 % H_2O_2 , та спалюють в атмосфері кисню. Далі вміст колби струшують протягом 5 хв, додають 3 мл концентрованої оцтової кислоти (CH_3COOH), 1 мл 0,1 % розчину $Zn(CH_3COO)_2$, суміш переносять у посудину для відновлення, додають 3 мл 4 % розчину $KMnO_4$ (для видалення надлишку H_2O_2), випарюють в атмосфері азоту та залишок витримують 1 год за $320^\circ C$. До залишку доливають 5 мл відновлювальної суміші. Далі розчин нагрівають 15 хв у потоці азоту. H_2S , який виділяється, поглинають 80 мл суміші (1 : 7) 0,25 М $Zn(CH_3COO)_2$ в 0,1 М CH_3COONa і води.

Метод 2. Пробу 250 мг сухого рослинного матеріалу (загальний вміст сірки 0,1–0,4 %) озолюють у трубчастій пічці в потоці кисню (швидкість 0,8 л/хв) за $1330^\circ C$ з використанням платини як каталізатора. Продукти термічного розкладання неорганічних сполук вловлюють 3 % розчином H_2O_2 (70 мл), який знаходиться у двох промивних склянках.

Визначення сульфід-іону за допомогою метиленового блакитного. Органічні дисульфіди, що розчиняються у воді, утворюють із сульфідами тіоли, які придатні для фотометричного визначення. Під час взаємодії сульфідів з п-аміно-N,N-диметиланіліном у присутності $FeCl_3$ з'являється синє забарвлення, інтенсивність якого пропорційна концентрації S^{2-} . Максимуми поглинання метиленового блакитного 735 і 660 нм. Для кількісного визначення сірки використовують максимум за 667 нм. Закон Бера виконується для 0,2–1 мкг S в 1 мл.

Для виконання роботи використовують озолення матеріалу за методом 1. Розчин, який утворюється після озолення рослинного зразка і його відновлення, витримують 10 хв за $20 \pm 1^\circ C$, додають 10 мл 0,093 % розчину п-аміно-N,N-диметиланіліну у 3,5 М H_2SO_4 і перемішують. Об'єм розчину доводять до 100 мл і через 15 хв вимірюють оптичну густину за 667 нм відносно реагенту. Розчин захищають від дії прямих сонячних променів. На розвиток забарвлення сильно впливає температура, тому всі реагенти повинні мати однакову температуру. Молярний коефіцієнт погашення S^{2-} розчину метиленового блакитного дорівнює $3,4 \cdot 10^4$. Чутливість визначення сірки становить 5–10 мкг у 100 мл розчину. Визначенню заважають NO_2^- , Cu^{2+} (>2 мкг), Fe, PO_4^{3-} (>5 мкг); не заважають K, NH_4^+ , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} (~ 1 мг), Cl^- , NO_3^- , SO_4^{2-} , CH_3COO^- .

Непряме визначення сірки методом фотометрії у полум'ї. Після озолення рослинного матеріалу у кисні сірку визначають за емісією барію у полум'ї

азот–ацетилен за лінією 553,55 нм або за 493 нм в полум'ї пропан–повітря. Запропонований також метод визначення за 493 нм у полум'ї водень–кисень. Дію інших зольних елементів, яка заважає, видаляють розкладанням рослинного матеріалу в потоці кисню за 1 330 °С.

Рослинний матеріал готується до визначення сірки за методом 2. Після того, як розкладання закінчено, вміст склянок переносять дистильованою водою в хімічну посудину ємністю 150 мл. Туди додають 10 мл реакційної суміші А і розчин випаровують досуха. До залишку після випаровування додають 25 мл розчину Б, багаторазово струшують і фільтрують. У фільтраті вимірюють емісію барію за довжини хвилі 493 нм у полум'ї водень–кисень; тиск водню дорівнює 100 мм водного стовпа (981 Н/м²), кисню – 1 атм (10⁵ Н/м²); ширина вхідної і вихідної щілин становить 0,08 мм.

Вміст сірки розраховують за допомогою калібрувального графіка, використовуючи для її побудови розчини H₂SO₄ відомої концентрації. Потрібну кількість H₂SO₄ (вміст сірки від 0,1 до 1 мг) примішують у реакційну склянку на 150 мл і після додавання 75 мл розчину 3 % H₂O₂ обробляють, як описано вище для дослідних розчинів.

Обладнання

1) платиновий кошик; 2) посудина для спалювання; 3) муфельна піч; 4) фарфорові або скляні чашки; 5) пробірки; 6) мірчі піпетки; 7) трубчаста піч для спалювання; 8) спектрофотометр; 9) полум'яний фотометр.

Реактиви

1) пероксид водню (H₂O₂) 33 % та 3 %; 2) оцтова кислота (CH₃COOH); 3) ацетат цинк (Zn(CH₃COO)₂) 0,1 % та 0,25 М розчин; 4) перманганат калію (KMnO₄) 4 % розчин; 5) ацетат натрію (CH₃COONa) 0,1 N розчин; 6) платина (Pt); 7) хлорид заліза (FeCl₃); 8) п-аміно-N,N-диметиланілін; 9) сірчана кислота (H₂SO₄).

Приготування реактивів

Розчин А: до 1,07 г BaCl₂·2H₂O і 0,50 г CaCO₃ додають 250 мл розведеної (1:1) HCl і доводять об'єм до 1 л дистильованою водою. 10 мл цього розчину вміщує ~6 мг Ba і 2 мг Ca.

Розчин Б: до 40 мл 37 % HCl додають дистильовану воду до 1 л.

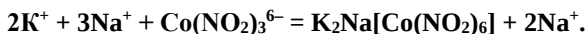
ПИТАННЯ ДЛЯ ПЕРЕВІРКИ ЗНАТЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Наведіть принципи методів підготовки та визначення сірки за цим методом.
2. Для чого використовується платина у другому методі спалення? Що таке каталіз?
3. Охарактеризуйте спектрофотометричний метод визначення сульфід-іону.

4. Наведіть характеристику визначення сульфідів у рослинному матеріалі за допомогою фотометрії у полум'ї.

РОБОТА 5.10. ВИЗНАЧЕННЯ КАЛІЮ КОБАЛЬТИНІТРИТНИМ МЕТОДОМ

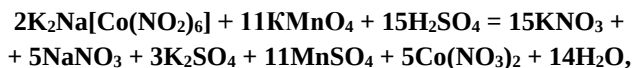
Принцип методу. Іон калію реагує з кобальтинітритом натрію $\text{Na}_3[\text{Co}(\text{NO}_2)_6]$, утворюючи подвійну комплексну сіль $\text{K}_2\text{Na}[\text{Co}(\text{NO}_2)_6]$. Реакція проходить за рівнянням:



Внаслідок реакції утворюється нерозчинний у воді жовтий кристалічний осад, легкокорозинний у лугах та сильних кислотах. Присутність у розчині інших іонів не заважає визначенню; виняток становить іон NH_4^+ , який також дає з кобальтинітритом жовту нерозчинну у воді сполуку. Тому кобальтинітритний метод можна використовувати тільки для аналізу розчинів, які не вміщують аміаку. Коли це невідомо наперед, необхідно провести якісну реакцію на аміак із реактивом Несслера. За необхідності аміак можливо видалити додаванням формаліну. Метод дуже чутливий. За невиконання умов осадження, крім $\text{K}_2\text{Na}[\text{Co}(\text{NO}_2)_6]$, який кристалізується з однією молекулою води, можуть утворюватися осад і солі іншого складу: $\text{KNa}_2[\text{Co}(\text{NO}_2)_6] \cdot \text{H}_2\text{O}$ і $\text{K}_3[\text{Co}(\text{NO}_2)_6] \cdot \text{H}_2\text{O}$. Деяка кількість таких солей може утворюватися і за виконання умов осадження, тому для розрахунків використовують калібрувальну криву, побудовану за допомогою точних розчинів KCl , де осадження калію кобальтинітритом ведеться строго за тих же умов.

Перебіг аналізу

Об'ємометричне визначення. Осад $\text{K}_2\text{Na}[\text{Co}(\text{NO}_2)_6]$ використовують для об'ємного визначення калію, оснований на окисленні його перманганатом. У сіркокислому середовищі, що утворюється за розчинення осаду, іон NO_2^- окислюється до NO_3^- семивалентним марганцем; за таких умов Mn^{7+} відновлюється до Mn^{2+} , а Co^{3+} – до Co^{2+} :



1 мл 0,02 N розчину перманганату відповідає приблизно 0,1–0,2 мг К. Але точну величину коефіцієнта визначають під час осадження калію за конкретних експериментальних умов із точно приготованих розчинів калієвих солей.

Аліквотну частину водної витяжки з рослинної тканини або нейтралізованої NaOH солянокислої витяжки з золи з вмістом калію біля 5 мг, а також зразкові розчини KCl приміщують у скляні центрифугальні пробірки, додають туди 0,01 N оцтову кислоту до рН 5 і добре перемішують струшуванням. Об'єм кислоти, необхідний для доведення рН, попередньо визначають на паралельних

пробах за допомогою рН-метра. У підкислений розчин краплями поступово додають 0,5 мл розчину тризаміщеного кобальтинітриду натрію. Пробірки закривають пробками і залишають їх на ніч. Далі осад центрифугують протягом 15 хв зі швидкістю 2–3 тис. об./хв. Надосадову рідину обережно зливають, додають у пробірки 1–2 мл холодної дистильованої води і знову центрифугують. Процедуру повторюють до повного знебарвлення промивних вод.

До осаду додають точну кількість 0,02 N KMnO_4 , яка перебільшує кількість, необхідну для розчинення осаду, та половинний об'єм 25 % H_2SO_4 . За умови вмісту калію у межах 5 мг необхідно приблизно 10 мл 0,02 N KMnO_4 . Осад обережно перемішують скляною паличкою і занурюють на 2–5 хв у водяну баню, нагріту до 60 °С, до повного розчинення осаду. Забарвлення розчину повинно бути інтенсивним. Якщо під час розчинення забарвлення стає блідим, необхідно швидко додати ще точну кількість KMnO_4 і кислоти. Не можна допустити знебарвлення розчину, бо тоді результати визначень будуть занижені від втрати діоксиду азоту. Після повного розчинення осаду розчини залишають ще на 10–15 хв і кількісно переносять водою в колби для титрування. У кожену колбу додають точно виміряну кількість 0,02 N розчину щавлевої кислоти (під час цього розчини знебарвлюється).

Кожну колбу підігрівають до 70–80 °С, і гарячий розчин титрують 0,02 N KMnO_4 , визначаючи надлишок щавлевої кислоти. Кількість KMnO_4 , що прореагує з осадом, визначають, віднімаючи із сумарного його об'єму, взятого за обидва рази, той об'єм, який пішов на реакцію зі щавлевою кислотою.

Колориметричне визначення. До промитого осаду нітрокобальтату калію додають 1 мл 5 % водного розчину ЕДТА і 1 мл 30 % розчину H_2O_2 , вміст пробірки перемішують і нагрівають на киплячій водяній бані до розчинення осаду. Утворений комплексонат кобальту має рожеве забарвлення. Оптичну густину розчину після охолодження вимірюють на фотоелектроколориметрі за синім світлофільтром або на спектрофотометрі за довжини хвилі 540 нм.

Для побудови калібрувального графіка використовують точні розчини K_2SO_4 .

Обладнання

1) центрифугальні пробірки об'ємом 10 мл; 2) центрифуга; 3) рН-метр; 4) водяна баня; 5) електрична плита; 6) колби об'ємом 100 мл; 7) бюретки для титрування на 25 мл; 8) пробірки об'ємом 10 мл; 9) фотоелектроколориметр або спектрофотометр.

Реактиви

1) кобальтинітрид натрію ($\text{Na}_3[\text{Co}(\text{NO}_2)_6]$) 20 % розчин; 2) хлорид калію (KCl) стандартний розчин; 3) оцтова кислота (CH_3COOH) 0,01 N розчин; 4) перманганат калію (KMnO_4) 0,02 N розчин; 5) щавлева кислота ($\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$) 0,02 N розчин; 6) ЕДТА 5 % розчин; 7) пероксид водню (H_2O_2) 30 % розчин.

Приготування реактивів

Реактив № 1. Розчин кобальтинітриту натрію готують, змішуючи 60 мл 15 % розчину нітрату кобальту ($\text{Co}(\text{NO}_3)_2$) у 20 % оцтовій кислоті (CH_3COOH) із 100 мл 30 % водного розчину нітрату натрію (NaNO_3). Після перемішування розчин продувають повітрям протягом кількох годин для видалення оксидів азоту, залишають розчин у темряві на ніч і відокремлюють осад, що випав, фільтруванням. Такий розчин може зберігатися у темряві в холодильнику протягом 15–20 днів.

ПИТАННЯ ДЛЯ ПЕРЕВІРКИ ЗНАЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Яке значення у життєдіяльності рослин відіграє калій, чим характеризується нестача цього елемента?
2. Наведіть характеристику кобальтиметричного методу визначення калію.
3. Які речовини і чому можуть заважати у визначенні калію цим методом?
4. Як здійснюється визначення калію за допомогою титрування?
5. Наведіть характеристику фотометричного методу визначення калію.
6. Який із наведених у роботі методів визначення калію, на вашу думку, є простішим та більш точним? Чому?

РОБОТА 5.11. ВИЗНАЧЕННЯ КАЛІЮ МЕТОДОМ ОСАДЖЕННЯ ТЕТРАФТОРБОРНОЮ КИСЛОТОЮ

Принцип методу. Вміст калію може бути визначений ваговим або титриметричними методами, основанийими на осадженні іонів калію аніонами тетрафторборної кислоти у вигляді солі KBF_4 . Перешкоджають визначенню іони Rb^+ і Cs^+ , але вони відсутні у золі рослин у значних кількостях. Цьому осадженню не заважають двовалентні катіони, іони Cl^- , NO_3^- , SO_4^{2-} , Li^+ , іони Na^+ , якщо його вміст не перевищує вміст калію більше ніж у 5 разів. Тетрафторборат натрію, на відміну від тетрафторборату калію, добре розчиняється у воді, тому метод, у принципі, може використовуватися і за умови великого вмісту натрію; останній в цьому випадку можна видалити попереднім промиванням осаду водою або розчином тетрафторборату амонію.

Перебіг аналізу. Наважку рослинного матеріалу озолують у муфелі, розчиняють у невеликій кількості концентрованої HCl , кількісно переносять у мірчу колбу об'ємом 50 мл і доводять водою до мітки, добре перемішуючи. Аліквотну частину розчину (5 мл) зі вмістом калію біля 20 мг переносять у поліетиленову пробірку і додають 10 % розчин HBF_4 у етанолі, так щоб кількісно BF_4^- у 5–6 разів перебільшувала стехіометричне відношення (3 мл). Концентрація етанолу під час осадження повинна становити 50 %, тому додають ще 2 мл етанолу і залишають розчин для коагуляції осаду на 30–40 хв. Рідину зверху декантують, осад переносять у зважений та доведений до постійної маси скляний тигель

Нуча, далі промивають 87 % етанолом до повного видалення слідів хлору за реакцією з 1 % розчином AgNO_3 . Якщо випадає AgCl , осад промивають ще 87 % етанолом до зупинення випадання осаду AgCl . Тигель з осадом KBF_4 розміщують під тягу і сушать потоком підігрітого повітря до зникнення спиртового запаху, далі висушують у сушильній шафі за 120°C до постійної маси і зважують.

Обладнання

1) муфельна піч; 2) мірчі колби об'ємом 50 мл; 3) поліетиленові пробірки об'ємом 10 мл; 4) скляні тиглі Нуча; 5) сушильна шафа; 6) аналітичні терези.

Реактиви

1) соляна кислота (HCl) концентрована; 2) тетрафторборна кислота (HBF_4) 10 % спиртовий розчин; 3) етиловий спирт ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) 87 % розчин; 4) нітрат срібла (AgNO_3) 1 % розчин.

ПИТАННЯ ДЛЯ ПЕРЕВІРКИ ЗНАНЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Наведіть принцип методу визначення вмісту калію у рослинному матеріалі з тетрафторборною кислотою.
2. Які речовини заважають визначенню?
3. Охарактеризуйте порядок проведення визначення калію за цим методом.
4. Порівняйте цей метод визначення калію з попереднім. Який із цих методів більш зручний, а який точніший?

РОБОТА 5.12. КОЛОРИМЕТРИЧНЕ ВИЗНАЧЕННЯ КАЛІЮ З РЕАКТИВОМ ГРІССА

Принцип методу. Метод дає змогу визначати від 0,1 до 0,5 мг калію у пробі. Він оснований на реакції подвійної комплексної солі калію $\text{CaK}_2[\text{Ni}(\text{NO}_2)_6]$ з реактивом Грісса. Практично у методі використовують визначення нітритів. Вміст калію розраховують виходячи з стехіометричних відношень: 2 атоми калію відповідають 6 групам NO_2^- . Метод відрізняється високою чутливістю.

Перебіг аналізу. 1 мл розведеної зольної витяжки зі вмістом калію не більше 5 мг переносять у пробірку, додають 0,1 мл концентрованої HCl і 5 мл реактиву, який осаджує калій. Для повного осадження осад залишають на 3 год. Його фільтрують через скляний фільтр у пробірку, яка приміщена в колбу Бунзена. Для кількісного перенесення осаду на фільтр використовують фільтрат або розведений вдвічі осаджуючий реактив. Осад на фільтрі підсушують пропусканням повітря протягом 1–2 хв, промивають ацетоном, насиченим $\text{CaK}_2[\text{Ni}(\text{NO}_2)_6]$, і знову підсушують. Далі до осаду додають 5 мл 3 % CH_3COOH , відсмоктують розчин в колбу Бунзена і промивають фільтр гарячою водою, фільтруючи у ту саму колбу. Розчин кількісно переносять у мірчу колбу на 100 мл. 2 мл розчи-

ну (зі вмістом калію не більше 0,5 мг) переносять у пробірку, додають 5 мл реактиву Грісса і колориметрують на фотоелектроколориметрі або спектрофотометрі. Розрахунки вмісту калію ведуть за калібрувальним графіком.

Побудова калібрувального графіка

Для побудови калібрувального графіка використовують точний розчин NaNO_2 . Для цього 0,2647 г перекристалізованого нітриту натрію розчиняють в 1 л води. Далі цей розчин розводять ще у 10 разів. За такого розведення 1 мл розчину відповідає 0,005 мг калію.

Обладнання

1) пробірки об'ємом 10 мл; 2) скляні фільтри Шотта; 3) колба Бунзена; 4) фотоелектроколориметр або спектрофотометр.

Реактиви

1) соляна кислота (HCl) концентрована; 2) хлорид кальцію (CaCl_2) насичений розчин; 3) нітрат нікелю ($\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$); 4) нітрит натрію (NaNO_2); 5) хлорид калію (KCl); 6) реактив Грісса; 7) оцтова кислота концентрована (CH_3COH).

Приготування реактивів

Реактив для осадження. Для приготування реактиву 100 мл насиченого водного розчину CaCl_2 фільтрують від кристалів, додають до нього 3 г $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$, 36 г перекристалізованого NaNO_2 і 1–2 мл розчину KCl , який відповідає 2 мг калію. Суміш залишають на ніч. Вранці осад відокремлюють фільтруванням. Прозорий розчин осаджувача стійкий протягом кількох тижнів.

ПИТАННЯ ДЛЯ ПЕРЕВІРКИ ЗНАНЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Дайте характеристику принципу методу визначення калію з реактивом Грісса.
2. Опишіть порядок проведення аналізу.
3. Які наслідки для життєдіяльності рослин має нестача калію?
4. Які функції виконує цей елемент у рослинах і чи може він бути заміненим іншими елементами?

РОБОТА 5.13. ОБ'ЄМОМЕТРИЧНЕ ВИЗНАЧЕННЯ КАЛІЮ ЗА ДОПОМОГОЮ ФЕРОЦІАНІДУ МАГНІЮ

Принцип методу. У методі використовується осадження калію у вигляді $\text{K}_2\text{Mg}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ з наступним титруванням його KMnO_4 .

Перебіг аналізу. 3,5 г рослинної тканини озолують в муфелі, розчиняють у декількох мл концентрованої HCl , кількісно переносять у мірчу колбу на 25 мл водою і доводять об'єм до мітки. 10 мл розчину зі вмістом калію приблизно 20–30 мг піпеткою переносять у мірчу пробірку на 15 мл, додають 1–2 краплі

індикатору нейтрального червоного і нагрівають до 50 °С. На кінчику скальпеля невеликими порціями додають порошок магnezії (MgO) до переходу забарвлення розчину в жовтувате; за таких умов випадає осад гідрооксидів кальцію, магнію, заліза, алюмінію і цинку. Пробірку охолоджують, розчин доводять до кінцевого об'єму водою і фільтрують через паперовий фільтр.

10 мл фільтрату переносять у пробірку об'ємом 25–30 мл із притертою пробкою, додають 5 мл 0,2 М розчину фероціаніду магнію і 8 мл 96 % етанолу. Пробірку струшують і залишають на 30 хв для «визрівання» осаду. До суспензії додають 4 мл дистильованої води, струшують і фільтрують через паперовий фільтр. Для кількісного перенесення осаду використовують фільтрат. Осад промивають 10 % розчином MgCl_2 у 32 % етанолі для видалення залишків осаджувача. Коли фільтрування закінчено, фільтр із лійки обережно виймають і віджимають між листами фільтрувального паперу, кілька разів міняючи його до тих пір, поки на ньому перестануть бути помітними вологі сліди. Фільтр підсушують у сушильній шафі за температури приблизно 60 °С до повного видалення запаху етанолу, далі його розкривають і опускають у склянку, в якій міститься 100 мл води і 10 мл H_2SO_4 (1 : 3). Розчин перемішують до повного розчинення осаду і титрують 0,05 N розчином KMnO_4 до переходу жовтого забарвлення у коричневе. Точка еквівалентності добре розрізняється. 1 мл 0,05 N розчину KMnO_4 відповідає 3,91 мг калію.

Обладнання

1) муфельна піч; 2) мірчі колби об'ємом 25 мл; 3) лійки; 4) паперові фільтри; 5) бюретки для титрування об'ємом 25 мл; 6) пробірки об'ємом 25 мл з притертими пробками.

Реактиви

1) соляна кислота (HCl) концентрована; 2) фероціанід магнію ($\text{Mg}_3[\text{Fe}(\text{CN}_6)]_2$) 0,2 М розчин; 3) етанол ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) 96 % та 32 %; 4) оксид магнію (MgO); 5) хлорид магнію (MgCl_2) 10 % розчин у 32 % етанолі; 6) сірчана кислота (H_2SO_4) (розведена водою 1 : 3); 7) перманганат калію (KMnO_4) 0,05 N розчин (приготований з фіксаналу).

Приготування реактивів

Реактив № 2. Для отримання фероціаніду магнію готують насичений розчин жовтої кров'яної солі – фероціаніду калію, і додають до нього концентровану HCl. Осад $\text{H}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, що випав, промивають у фільтрі до повного видалення залишків хлору. Осад переносять у склянку і додають до нього надлишок водної суспензії MgO до просвітлення розчину. Осад невикористаного MgO фільтрують, розчин фероціаніду магнію трохи упарюють і охолоджують до кристалізації.

ПИТАННЯ ДЛЯ ПЕРЕВІРКИ ЗНАЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Охарактеризуйте принцип методу визначення кальцію з фероціанідом магнію.
2. Наведіть послідовність виконання роботи.
3. Охарактеризуйте переваги та недоліки методу.

РОБОТА 5.14. КОЛОРИМЕТРИЧНЕ ВИЗНАЧЕННЯ КАЛЬЦІЮ З КАЛЬЦИОНОМ

Принцип методу. Для фотометричного визначення кальцію може бути використана здібність його іонів давати рожевий комплекс із реактивом «Кальціон-ІРЕА», який випускає промисловість. Сам реактив добре розчинний у воді, розчин стійкий, має синє забарвлення. У лужному середовищі (рН 11–13) іони кальцію утворюють із кальціоном рожевий комплекс, максимум поглинання якого знаходиться в межах 620 нм, де поглинання самого реагенту практично відсутнє. Забарвлення може бути підсилене ацетоном. Реакція утворення забарвленого комплексу дуже специфічна до кальцію, іони Mg^{2+} , Ba^{2+} , Si^{2+} не дають кольорової реакції. Іони міді, заліза і Cr^{6+} можуть утворювати слабко забарвлені комплекси з кальціоном, але максимуми їх поглинання далекі від максимумів для кальцієвого комплексу. Іони Mg^{2+} і Ba^{2+} не заважають за 50-кратного надлишку, Mo^{6+} і Zn^{2+} – за 100-кратного, K^+ , Na^+ , Rb^+ , Cs^+ – за 1 000-кратного. До того ж іони, що заважають, можуть бути замасковані триетаноламіном.

Перебіг аналізу. Пробу рослинного матеріалу озолнюють в муфелі з усією обережністю, необхідною для попередження втрат. До зольного залишку додають 1 мл 1 N HCl і досуха випарюють у витяжній шафі. Залишок розчиняють у невеликій кількості води, переносять у мірчу колбу і доводять до мітки водою, позбавленою CO_2 . 3 мл цього розчину переносять у пробірку, додають туди 0,25 мл 5 % триетаноламіну, добре перемішують, додаючи 0,75 мл ацетону (ч. д. а.), 0,5 мл 0,5 N NaOH і 0,5 мл 0,02 % розчину кальціону. Забарвлення з'являється через 10 хв, після чого вимірюють його оптичну густину на спектрофотометрі за 620 нм проти холостого досліджу, де є всі реактиви, крім рослинної проби. Під час великої кількості проб для більшої точності розчин кальціону додають через рівні проміжки часу за секундоміром; через такі самі проміжки часу через 10 хвилин проводять відлік.

Побудова калібрувального графіка

Для побудови калібрувального графіка застосовують двічі перекристалізовану і висушену сіль $CaCl_2$. Готують серію стандартних розчинів, які містять у 3 мл дослідного зразка від 1 до 10 мкг кальцію. Розчини готують у бідистиляті, вільному від CO_2 . Розчин NaOH також готують на прокип'яченому бідистиляті

і зберігають у склянці, з'єднаний із бюреткою, яка має трубки з натронним вапном для захисту від CO_2 .

Обладнання

1) муфельна піч; 2) фарфорові тиглі; 3) мірчі колби об'ємом 25 мл; 4) пробірки; 5) спектрофотометр.

Реактиви

1) соляна кислота (HCl) 0,1 N розчин; 2) бідистильована вода без CO_2 ; 3) кальціон; 4) триетаноламін ($\text{C}_6\text{H}_{15}\text{NO}_3$) 5 % розчин; 5) ацетон ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$); 6) гідроксид натрію (NaOH) 0,5 N розчин; 7) хлорид кальцію (CaCl_2) для стандартного розчину.

Приготування реактивів

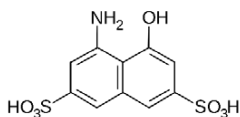


Рис. 23. Н-кислота

Синтез кальціону. 39,2 г 4-аміно-5-гідроксинафталін-2,7-дисульфокислоти (Н-кислоти), яка вміщує 34,1 г хімічно чистої моноватрієвої солі 1-аміно-8-нафтол-3,6-дисульфокислоти, вносять в 200 мл води, підкисленої 10 мл концентрованої HCl . До утвореної

суспензії із крапельної лійки поступово додають розчин, який містить 8,0 г NaNO_2 в 40 мл води. Суспензію постійно перемішують; сіро-біле забарвлення Н-кислоти зникає, випадають яскраво-жовті кристали діазосполуки. До кінця реакції перевіряють реакцію середовища за допомогою універсального індикаторного папірця: реакція середовища повинна бути слабкокислою. Якщо реакція нейтральна або слабколужна, необхідно додати кілька мл HCl . Склянку з суспензією примішують на баню з льодом і під час безперервного помішування тонким струменем вливають розчин NaOH (15 г NaOH у 45 мл бідистилату), не доводячи до спінування і розігрівання розчину. Суміш стає темно-синьою; її перемішують протягом 3 год за допомогою механічної мішалки і залишають на ніч у холодильнику.

Синю пасту відокремлюють на воронці Бюхнера через два шари полотна, переносять у склянку, заливають 200 мл киплячої води, перемішуючи 15–20 хв, і підкислюють 10 мл концентрованої HCl . Останню операцію необхідно проводити у витяжній шафі із закритим склом. Гарячу суміш знову фільтрують через полотно, віджимають і сушать за температури 100–105 °С до постійної маси. Отриманий кальціон – це чорний порошок із фіолетовим відтінком, добре розчинний у воді і нерозчинний в ацетоні, бензолі, хлороформі, етиловому та ізопропаноловому спиртах.

ПИТАННЯ ДЛЯ ПЕРЕВІРКИ ЗНАТЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Які функції виконує кальцій у рослинних організмах?
2. Як цей елемент взаємодіє з іншими елементами мінерального живлення?

3. Що таке антагонізм іонів? Наведіть приклади.
4. Охарактеризуйте принцип методу визначення кальцію у рослинному матеріалі.
5. Наведіть порядок виконання аналізу.

РОБОТА 5.15. ВИЗНАЧЕННЯ МАГНІЮ КОМПЛЕКСОМЕТРИЧНИМ МЕТОДОМ

Принцип методу. Для визначення магнію комплексометричним методом використовують витіснення його похідними ЕДТА з комплексу з еріохромом чорним Т. За умови значення рН середовища від 7 до 11 розчин цього барвника має синє забарвлення, за умови рН 12 – жовто-оранжеве. За умови додавання іонів металів забарвлення різко змінюється від синього до червоного. Забарвлені комплекси, крім іонів Mg^{2+} , дають іони Ca^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} та інші, тому під час визначення іони важких металів осаджують у вигляді гідроксидів або зв'язують додаванням ціаніду. У золі рослин кількість іонів важких металів зазвичай значно нижча, ніж концентрація Ca і Mg, тому у розведених розчинах вони суттєво не впливають на результати аналізу. Mg може знаходитися у золі в кількостях, порівнюваних із Ca, тому Ca необхідно видалити з розчину у вигляді $CaWO_4$; Mg визначають у фільтраті. Використовувати оксалат для видалення Ca не рекомендується, оскільки у присутності оксалатного комплексу магнію перехід забарвлення під час титрування погано видаляється.

Перебіг аналізу. Для визначення Mg в солянокислій витяжці розчини попередньо нейтралізують NaOH. До аликвотної частини розчину зі вмістом Mg приблизно 15–20 мг додають 2 мл хлоридно-аміачної суміші на кожні 100 мл розчину і на кінчику скальпеля – суміш еріохрому чорного Т з NaCl (1 : 100). Винночервоний розчин титрують 0,05 М розчином трилону В до синього забарвлення. Оскільки реакція витіснення Mg трилоном із комплексу з хромогеном проходить поступово, біля точки еквівалентності розчин комплексону додають краплями. Для прискорення реакції розчин, що титрується, можна підігріти до 50 °С. 1 мл ЕДТА відповідає 0,243 мг Mg. Під час визначення Mg в рослинних тканинах наважка обробляється в такий самий спосіб, як і під час визначення Ca.

Mg у присутності Ca можна визначити також за різницею. Для цього в аликвотній частині у присутності еріохрому чорного Т сумісно титрують Ca і Mg, як описано вище. Одночасно у паралельній колбі титрують Ca у присутності мурексиду. За різницею між цими титруваннями розраховують вміст Mg.

Обладнання

1) колби об'ємом 2–50 мл; 2) бюретки для титрування об'ємом 25 мл; 3) мірча колба об'ємом 1 000 мл.

Реактиви

1) соляна кислота (HCl) концентрована; 2) еріохром (хромоген чорний Т, $C_{20}H_{12}N_3O_7SNa$); 3) гідроксид натрію (NaOH) 10 % розчин; 4) хлорид натрію (NaCl); 5) мурексид ($NH_4C_8H_4N_5O_6$); 6) етилендіамінтетраоцтова кислота (ЕДТА, комплексон, $(HOOCCH_2)_2N(CH_2)_2N(CH_2COOH)_2$); 7) хлорид амонію (NH_4Cl) 50 % розчин; 8) гідроксид амонію (NH_4OH) 25 % розчин (концентрований).

Приготування реактивів

Хлоридно-аміачна буферна суміш. Для приготування буферного розчину 50 г NH_4Cl , розчиненого у 100 мл води, переносять у мірчу колбу на 1 л, додають 250 мл 25 % NH_4OH і доводять об'єм до 1 л. Зберігають буферний розчин у склянці з притертою пробкою.

Реактив № 2. Еріохром чорний Т готують у вигляді сухої суміші з NaCl (1 : 100). Для цього наважку солі розтирають у ступці, невеликими порціями додають індикатор, добре перемішують і зберігають у склянці з притертою пробкою.

ПИТАННЯ ДЛЯ ПЕРЕВІРКИ ЗНАТЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Яке значення має магній для рослинних організмів?
2. У якому вигляді він поглинається рослинами? Як вони долають низьку розчинність солей, що містяться у ґрунті?
3. Які ознаки нестачі магнію для рослин?
4. Наведіть принцип методу визначення магнію.
5. Які елементи заважають визначенню і як уникнути похибок?
6. Охарактеризуйте порядок виконання аналізу.

РОБОТА 5.16. ВИЗНАЧЕННЯ ЗАЛІЗА З О-ФЕНАНТРОЛІНОМ

Принцип методу. Метод оснований на вимірюванні інтенсивності забарвлення комплексу 1,10-фенантроліну ($C_{12}H_8N_2 \cdot H_2O$) з іонами Fe^{2+} .

Перебіг аналізу. Проби рослинного матеріалу (300–500 мг сирової маси) зважують на торсійних терезах, розмішують у фарфорові тиглі, озолують із 3–5 мл етанолу у муфелі за температури 450–500 °C з усією обережністю, необхідною для запобігання втратам матеріалу. Золу розчиняють у 4 мл концентрованої HCl і кількісно переносять невеликим об'ємом води у мірчу колбу об'ємом 50 мл. Можна використовувати і мокре озолення сумішшю H_2SO_4 і HNO_3 .

Для відновлення заліза до Fe^{2+} у колбу додають 4 мл 10 % розчину гідроксид-ламіну, і вміст енергійно струшують. Далі у суміш додають 1 мл 0,1 % розчину 1,10-фенантроліну у етанолі і кидають у розчин маленький (~2 × 2 мм) шматочок індикаторного паперу конго-рот. Папір забарвлюється у синій колір. У колбу

краплями починають доливати концентрований розчин аміаку, струшуючи рідину після кожної краплі до тих пір, поки індикаторний папір не почервоніє від однієї краплі. Червоно-оранжеве забарвлення з'являється через 5 хв і відрізняється великою стійкістю. Оптичну густину розчину вимірюють на спектрофотометрі за 510 нм. Вміст заліза розраховують у мг на 1 г сухої маси тканини за калібрувальним графіком.

Побудова калібрувального графіка

Для побудови калібрувального графіка використовують перекристалізований сульфат закисного заліза ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Стандартний розчин готують, зважуючи 1 г солі і розчиняючи у 50 мл 0,1 N H_2SO_4 . Калібрувальні розчини готують шляхом розведення в інтервалі від 0,2 до 2 мкг Fe на 1 мл.

Обладнання

1) фарфорові тиглі; 2) торсійні терези; 3) муфельна піч; 4) мірчі колби об'ємом 50 мл; 5) спектрофотометр.

Реактиви

1) соляна кислота (HCl) концентрована; 2) гідроксиамін (NH_2OH) 10 % розчин; 3) 1,10-фенантролін ($\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 0,1 % розчин у етанолі; 4) гідроксид амонію (NH_4OH) 25 % розчин; 5) сульфат заліза закисний ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0,1 N розчин у H_2SO_4 .

ПИТАННЯ ДЛЯ ПЕРЕВІРКИ ЗНАТЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Яку роль відіграє залізо у життєдіяльності рослин?
2. Як відображується нестача заліза на рослинних організмах?
3. Наведіть характеристику принципу методу визначення заліза з 1,10-фенантроліном.
4. Яка послідовність виконання аналізу?

РОБОТА 5.17. ВИЗНАЧЕННЯ ЗАЛІЗА СУЛЬФОСАЛІЦИЛОВИМ МЕТОДОМ

Принцип методу. Метод оснований на тому, що іони заліза утворюють із сульфосаліциловою кислотою ($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_6\text{S}$) низку забарвлених комплексів. Реакцію утворення комплексу використовують для визначення Fe^{3+} у кислому середовищі і суми Fe^{3+} і Fe^{2+} у лужному середовищі. У лужному середовищі іони Fe^{2+} окислюються до Fe^{3+} , тому все залізо, що вміщує розчин, визначається з сульфосаліциловою кислотою. Необхідна лужність середовища утворюється додаванням аміаку. Метод дає змогу визначати від 5 до 50 мкг заліза у пробі. Моно- і трисульфосаліцилати заліза мають максимуми поглинання відповідно 510 нм ($\epsilon = 1\,600$) та 416 нм ($\epsilon = 4\,000$).

Перебіг аналізу. Аліквотну частину зольної витяжки зі вмістом заліза більше 5 мкг приміщують у мірчу колбу на 50 мл, додаючи туди 5 мл 25 % розчину сульфосаліцилової кислоти у воді. Реактив необхідно готувати в день визначення і зберігати в темній склянці. У колбу кидають шматочок індикаторного паперу конго-рот і додають краплями 25 % розчин аміаку до переходу кольору індикаторного паперу з червоного в синій. Забарвлення розчину підсилюється за нейтралізації. Колір розчину переходить із червоно-фіолетового (в кислому середовищі) у жовтий. Іноді розчин мутнішає внаслідок випадіння гідроксидів. У такому разі необхідно внести додаткову кількість сульфосаліцилової кислоти до прояснення розчину і додати ще аміаку до появи сильного запаху. Розчин доводять водою до мітки. Аміак повинен бути вільним від CO_2 , інакше осад CaCO_3 і MgCO_3 , що випаде, може бути причиною помутніння розчину. Жовтий комплекс колориметрують на фотоелектроколориметрі або спектрофотометрі у синіх променях через 5 хв після додавання реактивів. Під час стояння розчин може набути бурого кольору через випадіння гідрату двооксиду марганцю. Якщо у пробі міститься велика кількість марганцю, забарвлення розчину зразу буде мати бурий або коричневий відтінок. У такому разі визначення повторюють із новою порцією зольної витяжки, до якої для утримання в розчині іона Mn^{4+} додають 5 мл 10 % розчину солянокислого гідроксиламіну.

Побудова калібрувального графіка

Калібрувальний графік будують в інтервалі від 0,05 до 0,5 мг Fe у пробі, використовуючи точні розчини солей заліза – солі Мора, або закисного сірчано-кислого заліза. У розчин додають 2–3 краплі концентрованої HNO_3 для переведення заліза в оксидну форму. Як стандартний розчин можуть бути використані і залізоамонійні квасці. У такому разі 864 мг солі $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 24\text{H}_2\text{O}]$ розчиняють у мірчій колбі ємністю 1 л в 0,5 л 5 % H_2SO_4 , додаючи 2–3 краплі концентрованої HNO_3 , перемішують, доводять до мітки 5 % розчином H_2SO_4 і знову добре перемішують. Такий розчин містить 0,1 мг заліза в 1 мл. Робочі стандартні розчини з необхідним вмістом заліза готують у день аналізу розведенням водою.

Обладнання

1) мірні колби об'ємом 50 мл; 2) фотоелектроколориметр або спектрофотометр; 3) індикаторний папір конго-рот.

Реактиви

1) сульфосаліцилова кислота ($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_6\text{S}$) 25 % розчин; 2) гідроксид амонію (NH_4OH) 25 % розчин; 3) сіль Мора або сульфат заліза II для побудови калібрувального графіка; 4) азотна кислота (HNO_3) концентрована.

ПИТАННЯ ДЛЯ ПЕРЕВІРКИ ЗНАТЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Наведіть характеристику принципу методу визначення заліза з сульфосалициловою кислотою.
2. Яка послідовність виконання аналізу?

РОБОТА 5.18. ВИЗНАЧЕННЯ МІДІ З ДІЕТИЛДИТІОКАРБАМАТОМ

Принцип методу. Метод оснований на утворенні розчинного в органічних розчинниках комплексу іонів Cu^{2+} з діетилдитіокарбаматом. Із цією сполукою забарвлені комплекси утворюють також іони інших металів. Усі вони мають різні константи стійкості. Для визначення міді як реагенту використовують безкольорову і стабільну сіль свинцю. Іон міді витіскає свинець, утворюючи забарвлений комплекс. Крім міді, тільки іони срібла і ртуті утворюють із діетилдитіокарбаматом сполуки з великою константою стійкості, і тому можуть витіснити свинець із комплексу. Оскільки ці іони у рослинних тканинах практично відсутні, метод специфічний для міді. Реакцію проводять у лужному середовищі, що може супроводжуватися утворенням у розчині гідроксидів заліза, марганцю та інших металів. Щоб запобігти цьому, використовують хлороформовий розчин діетилдитіокарбамату свинцю: комплекс міді з діетилдитіокарбаматом розчиняють у хлороформі, і оптичну густину хлороформових витяжок вимірюють на спектрофотометрі. У присутності аніонів лимонної кислоти як додаткового комплексоутворювача гідроксиди заліза, марганцю, цинку тощо залишаються в водній фазі.

Перебіг аналізу. Для визначення міді використовують ефірну витяжку з 6 N солянокислого розчину золи. Сухий залишок після випаровування ефіру обробляють 4 мл 30 % розчину цитрату амонію, переносять за допомогою 10 мл води у ділильну лійку на 100 мл і додають краплю індикатора крезол-роута. Далі по краплі доливають 2 N розчин аміаку до переходу забарвлення у фіолетове ($\text{pH} \sim 8,5$), і після цього додають 10 мл розчину діетилдитіокарбамату свинцю. Ділильні лійки енергійно струшують протягом 5 хв (краще використовувати апарат для струшування). Після відокремлення фаз хлороформовий шар переносять у пробірку, додаючи туди на кінчику скальпеля безводний Na_2SO_4 для видалення крапель води і вимірюють оптичну густину на спектрофотометрі за довжини хвилі 436 нм проти контролю на реактиви, обробленого таким самим способом.

Побудова калібрувального графіка

Для побудови калібрувального графіка в межах від 1 до 25 мкг міді у пробі використовують розчин сульфату міді ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). Стандартні розчини обробляють так само, як і дослідні, починаючи з моменту екстракції іонів Cu^{2+} із підкислених HCl розчинів в ефір. Іони Cu^{2+} сильно абсорбуються склом, тому стандартний розчин необхідно готувати в день використання. Посуд рекомендується перед визначенням вимити 1 % HNO_3 та багаторазово сполоснути бідистильованою водою.

Обладнання

1) тиглі для спалювання; 2) ділильні лійки об'ємом 100 мл; 3) спектрофотометр.

Реактиви

1) цитрат амонію ($(\text{NH}_4)_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) 30 % розчин; 2) гідроксид амонію (NH_4OH) 2 N розчин; 3) діетилдитіокарбамат свинцю; 4) сульфат натрію (Na_2SO_4) безводний; 5) азотна кислота (HNO_3) 1 % розчин; 6) соляна кислота (HCl) концентрована та 6 N розчин; 7) сульфат міді ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$).

Приготування реактивів

Реактив № 1. Для приготування розчину цитрату амонію 30 г двозаміщеного цитрату амонію розчиняють у 70–80 мл води, двічі екстрагують невеликою кількістю хлороформового розчину діетилдитіокарбамату свинцю. Хлороформову фазу відкидають, розчин кип'ятять 10 хв, фільтрують, охолоджують і доводять водою у мірчій колбі до 100 мл.

Реактив № 3. Для приготування розчину діетилдитіокарбамату свинцю 300 мг ацетату свинцю (CH_3COO)₂Pb розчиняють у 50 мл води. До розчину додають 1,5 г сегнетової солі (K, Na тарtrat), підлучують розчин кількома краплями концентрованого КОН до появи слабко-рожевого забарвлення за фенолфталеїном (рН 9–10), далі додають 1,5 г KCN. *Робота з ціанідами потребує великої обережності!* Окремо розчиняють у 50 мл води 400 мг натрієвої солі діетилдитіокарбамату, і розчини змішують; за цього утворюється суспензія. Останню переливають у велику ділильну лійку і екстрагують 500 мл хлороформу за енергійного струшування. Водну фазу ще раз екстрагують 200 мл хлороформу. Хлороформові фракції об'єднують, двічі промивають половинним об'ємом води, фільтрують і доводять до 2 л хлороформом. Такий розчин може зберігатися у темряві протягом 2 тижнів.

ПИТАННЯ ДЛЯ ПЕРЕВІРКИ ЗНАТЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Охарактеризуйте роль міді у життєдіяльності рослин. У яких процесах рослинних організмів він бере участь?
2. Відомо, що мідь належить також до важких металів. За яких умов із мікроелемента мідь перетворюється на токсичну для рослин речовину?
3. Наведіть принцип методу визначення міді у рослинних тканинах. Які елементи заважають визначенню?
4. Як будується калібрувальний графік для визначення міді?

РОБОТА 5.19. КОЛОРИМЕТРИЧНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ЦИНКУ З ДИТИЗОНОМ

Принцип методу. Метод оснований на отриманні забарвленого комплексу цинку з дитизоном. Цей комплекс може бути екстрагований CCl_4 і колориметрований без видалення надлишку дитизону (метод змішаного забарвлення). Сліди міді, свинцю, срібла і деяких інших мікроелементів залишаються у водній фазі внаслідок утворення міцних комплексів із тіосульфатом, який застосовується у методі для цих цілей.

Перебіг аналізу. Солянокислий розчин золи розводять так, щоб вміст Zn в ньому був від 0,2 до 1 мкг/мл, а концентрація HCl приблизно 0,3 N. Для цього під час приготування сильно розведених розчинів використовують не тільки воду, а і розчини HCl . 10 мл розведеного розчину вносять у ділильну лійку ємністю 50–100 мл, додають 2 краплі індикатору метилового червоного і краплями розчин аміаку до переходу забарвлення від рожевого до жовтого. У ділильну лійку доливають 5 мл ацетатного буфера, 1 мл 25 % розчину тіосульфату натрію і добре перемішують. Із бюретки додають 20 мл розчину дитизону в CCl_4 , закривають лійку і енергійно струшують протягом 1 хв. Після розшаровування оптичну густину забарвленого шару CCl_4 вимірюють на фотоелектроколориметрі з зеленим світлофільтром або на спектрофотометрі за довжини хвилі 538 нм. Обчислення вмісту цинку ведуть за калібрувальним графіком.

Побудова калібрувального графіка

Для побудови калібрувального графіка (2–10 мкг Zn у пробі) використовують ZnCl_2 , отриманий розчиненням металічного Zn у HCl . Для цього 100 мг чистого металічного Zn приміщують у мірчу колбу об'ємом 500 мл і розчиняють у 10 мл 20 % HCl ; після розчинення Zn об'єм розчину доводять до мітки бідистильованою водою. Такий розчин містить 200 мкг/мл Zn . Розведенням готують робочі розчини, використовуючи для цього 0,3 N розчин HCl .

Обладнання

1) пробірки об'ємом 10 мл; 2) ділильні лійки об'ємом 50 або 100 мл; 3) фотоелектроколориметр або спектрофотометр; 4) мірчі колби об'ємом 500 та 1 000 мл.

Реактиви

1) соляна кислота (HCl) 0,3 N розчин; 2) ацетатний буфер pH 5; 3) вуглець чотирьохлористий (CCl_4); 4) тіосульфат натрію ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 25 % розчин; 5) дитизон розчин у CCl_4 ; 6) цинк металічний (Zn) для побудови калібрувального графіка.

Приготування реактивів

Реактив № 2. Для приготування ацетатного буфера (pH 5) 272 г кристалічного ацетату натрію ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) розчиняють у бідистильованій воді, додають 58 мл концентрованої CH_3COOH і доводять об'єм до 1 л бідистиллятом.

Для виявлення слідів Zn пробу розчину обробляють дитизоном у CCl_4 . До 10 мл розчину доливають 1 мл розчину дитизону і струшують; дитизон не повинен змінювати свого яскраво-зеленого забарвлення. За необхідності весь розчин обробляють дитизоном у ділительній лійці до тих пір, поки забарвлення перестане змінюватися. Після цього розчин промивають 2–3 рази перегнаним CCl_4 для видалення слідів дитизону; екстракти повинні стати безбарвними.

Реактив № 4. Розчин тіосульфату натрію (25 %) готують на бідистилаті і обробляють дитизоном, як описано вище, для повного видалення слідів цинку.

Реактив № 5. Розчин дитизону (запасний) у CCl_4 готують розчиненням 0,04 г кристалічного дитизону у 100 мл CCl_4 під час енергійного струшування протягом 15 хв. Розчин переливають у ділительну лійку на 250 мл і додають 100 мл розведеного аміаку (0,5 мл концентрованого аміаку на 100 мл води). Лійку струшують – дитизон переходить у водну фазу, забарвлюючи її в яскраво-оранжевий колір. Шар CCl_4 зливають і відкидають; водну фазу промивають невеликими порціями (5–10 мл) чистого CCl_4 , поки він не почне забарвлюватися в зелений колір. Далі водну фазу підкислюють 2,5 мл розведеної H_2SO_4 (1 : 5), додають до неї 100 мл CCl_4 , струшують, відокремлюють зелений шар дитизону в CCl_4 і зливають його в чисту ділительну лійку. Розчин промивають 3 рази (порціями по 50 мл) бідистилатом для видалення слідів H_2SO_4 , фільтрують через промитий і висушений фільтр у темну склянку з притертою пробкою і зберігають у холодильнику. Для приготування робочого розчину перед визначенням 15 мл вихідного розчину дитизону розводять CCl_4 у мірчій колбі на 0,5 л. Перевіряють чистоту реактивів за допомогою струшування 5 мл розчину з 25 мл 0,01 N аміаку. Шар CCl_4 повинен бути безбарвним. Якщо він забарвлений у бурий колір, розчин дитизону для аналізу непридатний.

ПИТАННЯ ДЛЯ ПЕРЕВІРКИ ЗНАТЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Яке значення для рослин має цинк? Чи входить він до складу білкових комплексів, наприклад, ферментів?
2. За яких умов може відбуватися негативний вплив цинку на рослинні організми?
3. Наведіть принцип методу визначення вмісту цинку у рослинах.
4. Охарактеризуйте методику побудови калібрувального графіка для визначення цинку.
5. Яких умов потрібно дотримуватися під час приготування реактивів?

РОБОТА 5.20. ВИЗНАЧЕННЯ МАРГАНЦЮ ПЕРСУЛЬФАТНИМ МЕТОДОМ

Принцип методу. Метод оснований на вимірюванні оптичної густини забарвлення аніона марганцевої кислоти, що виникає під час окислення Mn^{2+} до Mn^{7+} солями надсірчаної кислоти ($H_2S_2O_8$) у присутності іонів Ag^+ . Реакція протікає в азотнокислому і сірчанокислому середовищі. HCl заважає визначенню, оскільки реагує з марганцем, відновлюючи Mn^{7+} до Mn^{2+} . Реакція проходить у присутності у середовищі фосфорної кислоти, яка розчиняє основні солі, чим запобігає випадінню осаду гідроксиду чотиривалентного марганцю ($MnO_2 \cdot H_2O$). Як каталізатор використовують $AgNO_3$. Під час взаємодії персульфатів із розчинними солями срібла утворюється пероксидна сполука срібла, яка відповідає формулі $3Ag_2O_2 \cdot AgNO_3$. За умови нагрівання вона легко розкладається з виділенням озону, що окислює Mn^{2+} до Mn^{7+} . Реакція проходить поступово. Присутність у середовищі фосфорної кислоти стабілізує цю реакцію.

Перебіг аналізу. Осад, що утворився після сухого озолення в тиглі, змочують концентрованою HNO_3 для переведу хлоридів у нітрати, упарюють досуха, повторюють процедуру і знову упарюють. Осад переносять у 20 мл гарячої води, додають 1 мл концентрованої ортофосфорної кислоти ($d = 1,7$) і 1 мл 0,5 % розчину $AgNO_3$. Тигель накривають годинниковим склом і ставлять на водяну баню на 20 хв. Сліди Cl^- , що залишилися в суміші, викликають появу осаду $AgCl$. Розчин фільтрують через щільний паперовий фільтр у хімічну склянку. Тигель і фільтр промивають невеликими порціями 5 % H_2SO_4 , фільтрати об'єднують, і в розчин додають 5 мл 25 % розчину персульфату амонію. Далі розчин підігрівують до початку кипіння, знімають із плитки і знову вносять кілька крапель персульфату. Якщо інтенсивність фіолетового забарвлення за таких умов збільшиться, додають ще персульфат до появи стійкого забарвлення. Розчин охолоджують, кількісно переносять у мірчу колбу об'ємом 50 мл і доводять до мітки 5 % H_2SO_4 . Фіолетове забарвлення стійке; воно не повинно мати червоного відтінку, що свідчить про недостатню кислотність розчину. У такому разі перед доведенням розчину до мітки у колбу необхідно додати кілька крапель концентрованої H_2SO_4 і добре перемішати вміст.

За великого вмісту Mn^{2+} у розчині персульфат може окислити його тільки до Mn^{4+} , що супроводжується утворенням бурого осаду. Для попередження цього додають кілька крапель концентрованої H_2SO_4 і 2–3 краплі 3 % H_2O_2 . Розчин кип'ятять 5–10 хв для повного розкладання H_2O_2 . Після кип'ятіння додають ще персульфат і діють із розчином так, як було описано вище. Оптичну густину розчину вимірюють на фотоелектроколориметрі за жовтим світлофільтром або на спектрофотометрі за довжини хвилі 528 нм.

Побудова калібрувального графіка

Калібрувальний графік будують в інтервалі від 0,1 до 1 мкг Мп у пробі, використовуючи для цього титрований розчин KMnO_4 . Для приготування останнього можна скористатися фіксаналом або приготувати 0,1 N розчин за розрахунком.

Наважку KMnO_4 розчиняють у 200 мл 5 % H_2SO_4 , додають у розчин краплями 3 % H_2O_2 до його знебарвлення і кип'ять 10 хв для розкладання H_2O_2 . Розчин, що утворився, кількісно переносять у літрову мірчу колбу і доводять водою до мітки. 1 мл 1 N розчину KMnO_4 відповідає 1,1 мг Мп у 1 мл. Подальше розведення роблять бідистилятом. У кожному склянку розміщують знебарвлений розчин у кількості, необхідній для отримання заданих концентрацій, додають 1 мл концентрованої H_3PO_4 , персульфат, AgNO_3 та інші реактиви за попередньою схемою, аналогічно тому, як це робили з дослідними розчинами.

Потрібно враховувати, що водні розчини персульфату нестійкі, і їх готують перед самим використанням.

Обладнання

1) фарфорові тиглі; 2) годинникове скло; 3) хімічна склянка об'ємом 100 мл; 4) мірча колба об'ємом 50 мл; 5) мірча колба об'ємом 1 000 мл; 6) фотоелектроколориметр або спектрофотометр.

Реактиви

1) азотна кислота (HNO_3) концентрована; 2) нітрат срібла (AgNO_3) 0,5 % розчин; 3) сірчана кислота (H_2SO_4) 5 % розчин; 4) персульфат амонію $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ 25 % розчин; 5) пероксид водню (H_2O_2); 6) перманганат калію (KMnO_4) 0,1 N розчин.

Приготування реактивів

Реактив № 4. Сухий персульфат амонію також легко розкладається, тому його зберігають у темній склянці зі щільно притертою пробкою. Для перевірки реактиву, що довго зберігався, на вміст у ньому персульфату, наважку 1 г розміщують у мірчу колбу об'ємом 100 мл, додають 50 мл 10 % розчину йодиду калію і 10 мл 10 % розчину H_2SO_4 , добре перемішують і закривають пробкою. Дають відстоятись 30 хв за умови періодичного струшування і доводять об'єм до мітки водою, перемішують, беруть піпеткою Мора 20 мл і титрують 1 N розчином $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. 1 мл 0,1 N розчину тіосульфату відповідає 114 мг персульфату амонію. Гарний реактив містить не менше 75 % персульфату; якщо його вміст менший, необхідно збільшити кількість реактиву, що додається у пробу. За умови дуже низького вмісту реактив краще замінити.

ПИТАННЯ ДЛЯ ПЕРЕВІРКИ ЗНАТЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Наведіть характеристику марганцю як елемента мінерального живлення. До якої групи він належить, у яких процесах життєдіяльності бере участь?

2. Опишіть принцип методу визначення марганцю у рослинному матеріалі. Чому після розчинення спаленого матеріалу у соляній кислоті розчинник потрібно видалити?

3. Як здійснюється виконання аналізу за цим методом?

4. Наведіть методику побудови калібрувального графіка.

5. Яких правил необхідно дотримуватися під час роботи та приготування реактивів?

6. Як визначити придатність персульфату амонію для аналізу?

РОБОТА 5.21. ВИЗНАЧЕННЯ БОРУ З ХІНАЛІЗАРИНОМ

Принцип методу. У концентрованій H_2SO_4 хіналізарин ($\text{C}_{14}\text{H}_8\text{O}_6$) утворює з H_3BO_3 складний ефір – комплексну сполуку з характерним синім забарвленням. У різних модифікаціях методу використовують декілька різних концентрацій H_2SO_4 . Під час визначення бору в концентраціях від 0,2 до 4 мкг в 1 мл найвища чутливість спостерігається за умови кінцевої концентрації кислоти 92–94 %. Чутливість методу можна збільшити, якщо під час визначення застосувати олеум (концентрована H_2SO_4 , пересичена сірчаним ангідридом). Але робота з олеумом небезпечна, оскільки пари SO_3 викликають корозію металічних частин оптичних приладів. Тому частіше працюють із концентрованою H_2SO_4 , яка не містить додаткового SO_3 , а чутливість методу збільшують завдяки використанню кювет із більшою величиною оптичного шляху, а також підбираючи оптимальну концентрацію хіналізарину.

Під час визначення бору у тканинах за цим методом необхідно дотримуватися засобів безпеки для збереження зразків і від втрат бору, і від забруднення. Середню пробу свіжого або сухого матеріалу подрібнюють за допомогою металевих інструментів (ножиці, подрібнювачі), але не застосовують фарфорові ступки. Можна використовувати агатові або металеві ступки, а також ступки з оргскла або тefлону. Нemoжливе озолення мокрим способом, оскільки сполуки бору з кислих розчинів летять разом із парами, а це може призвести до відчутних втрат. Для сухого озолення не можна використовувати фарфорові тиглі. Зазвичай зразки рослинних тканин озолують у платинових або, у крайньому разі, у кварцових тиглях. Для запобігання втратам бору під час озолення додають луг або оксид кальцію.

Визначенню бору хіналізариним методом сильно заважають іони F^- , які зв'язують бор у дуже міцний, особливо в кислому середовищі, борофтористоводневий комплекс. Але кількість фтору у рослинах зазвичай дуже низька; у зольних витяжках вміст його значно менший за допустиму межу (2,5 мкг у пробі). Такий самий комплекс, як бор, утворює з хіналізарином германій. Цей елемент присутній тільки в рослинах, що ростуть поблизу покладів германію. Заважають

визначенню бору також окисники (MnO_3 , нітрати, хлорати, персульфати). У золі рослин можуть міститися нітрати і марганцева кислота; для їх видалення у зольні екстракти і витяжки додають відновники, насамперед гідразин.

Перебіг аналізу. Наважку рослинного матеріалу розміщують у платиновий тигель, додають на кінчику скальпеля порошок CaO і озолують у муфелі за температури не вище 500°C . Якщо рослинний матеріал багатий солями органічних кислот, допустиме озолення в муфелі без добавок, оскільки ці природні основи перешкоджають летючості бору у вигляді H_3BO_3 .

Золу розчиняють у 5–10 мл $0,36\text{ N H}_2\text{SO}_4$ і фільтрують через невеликий беззольний фільтр у колбу зі скла, яке не містить бору. Іноді під час розчинення золи в кислоті з'являється рожеве забарвлення внаслідок утворення аніона марганцевої кислоти, що заважає визначенню бору. У такому разі до забарвленого розчину додають 1 мл розчину гідразину і фільтрують його; фільтр промивають деякою кількістю $0,4\text{ N H}_2\text{SO}_4$, використовуючи промивні води для доведення розчину до визначеного об'єму. 0,5 мл фільтрату додають у пробірку або колбочку з безборного скла з притертою пробкою. Із бюретки додають 10 мл розчину хіналізарину в H_2SO_4 (20 мг реактиву на 1 л $94\% \text{ H}_2\text{SO}_4$). *Обережно: відбувається розігрівання розчину!* Вміст пробірки перемішують, закриваючи її пробкою, і розчин охолоджують на повітрі. Забарвлення стабілізується поступово. У зразків вимірюють оптичну густину на фотоелектроколориметрі за оранжевим світлофільтром у кюветках із товщиною шару 30 мм проти розчину хіналізарину. Якщо нема колориметра з оранжевим світлофільтром, можна замість світлофільтра використовувати додаткові скляні кювети товщиною 10 мм, заповнені 10% розчином біхромату калію у воді. Вибір світлофільтру важливий, оскільки у методі одне забарвлення (комплекс) вимірюють на фоні іншого (самого хіналізарину). Можна також вимірювати оптичну густину розчину на спектрофотометрі за довжини хвилі 640 нм. Вміст бору розраховують за допомогою калібрувального графіка.

Побудова калібрувального графіка

Для побудови калібрувального графіка використовують інтервал концентрацій бору від 1 до 10 мкг у пробі. Для цього готують вихідний розчини перекристалізованої H_3BO_3 , який містить 0,5 мг бору в 1 мл. Його готують розчиненням 2,8578 г H_3BO_3 в 1 л дистильованої води. Подальше розведення проводять водою за розрахунком.

Для приготування розчину $0,36\text{ N H}_2\text{SO}_4$ 10 мл концентрованої H_2SO_4 доводять водою до 1 л. Зберігати розчин краще в парафінованому посуді.

Обладнання

1) платиновий тигель; 2) муфельна піч; 3) беззольні фільтри; 4) колби зі скла, яке не містить бору; 5) пробірки з безборного скла з притертою пробкою; 6) фотоелектроколориметр або спектрофотометр.

Реактиви

1) оксид кальцію (CaO); 2) сірчана кислота (H_2SO_4) 0,36 N, 0,4 N та 94 % розчини; 3) гідразин (N_2H_4); 4) хіналізарин ($\text{C}_{14}\text{H}_8\text{O}_6$) розчин в H_2SO_4 .

Приготування реактивів

Реактив № 3. Для приготування розчину гідразину 1,5 г сульфату гідразину заливають 100 мл 0,36 N H_2SO_4 , періодично струшують і настоюють протягом години. Такий розчин близький до насиченого, тому на дні колби можлива поява осаду.

Реактив № 4. Хіналізарин часто забруднений алізарином і тому не годиться для аналізу малих кількостей бору. Продажний реактив очищують так: наважку у 2 г реактиву розтирають у фарфоровій ступці, розмішують зі 150 мл 80 % CH_3COOH за умови нагрівання на водяній бані у витяжній шафі. Осад відокремлюють на лійці Бюхнера і промивають кілька разів водою. Під час відмивання від CH_3COOH промивні води набувають жовтого забарвлення. Відмитий водою осад промивають послідовно етанолом, етиловим ефіром і висушують на повітрі. Переносять осад у колбу зі зворотним холодильником і розчиняють у мінімальній кількості перегнаного ацетону за умови нагрівання на водяній бані. Гарячий розчин фільтрують через паперовий фільтр у фарфорову чашку, злегка упарюють ацетон на бані у витяжній шафі та охолоджують. Осад, що випав, відокремлюють на лійці Бюхнера і висушують на повітрі.

ПИТАННЯ ДЛЯ ПЕРЕВІРКИ ЗНАНЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. До якої групи елементів належить бор? Які ознаки нестачі бору у живленні рослин?
2. Наведіть принцип методу визначення бору.
3. Які забруднювачі заважають визначенню елемента у рослинному матеріалі? Як їх позбутися?
4. Охарактеризуйте перебіг виконання аналізу.
5. Як будується калібрувальний графік? Для чого він потрібен?
6. Як проводиться очистка реактивів, які використовуються для аналізу?

РОБОТА 5.22. ВИЗНАЧЕННЯ МОЛІБДЕНУ РОДАНІДНИМ МЕТОДОМ

Принцип методу. Іони Mo^{5+} у кислому середовищі утворюють із роданідом комплекс, забарвлений в оранжевий колір, що дає змогу використовувати цю реакцію для колориметричного визначення елемента. За дотримання визначених умов комплекс відповідає одній із наступних формул: $\text{Mo}(\text{SCN})_5$ або $\text{K}_2\text{MoO}_4(\text{SCN})_5$. Як відновник, що запобігає окисленню іонів Mo^{5+} до Mo^{6+} , використовують двохлористе олово. Для утворення найбільш яскравого і стійкого забарвлення необхідно підтримувати визначену кислотність розчину. Необхідно

також дотримуватися визначеної послідовності внесення реактивів. Спочатку додають роданід, далі SnCl_2 . Під час відновлення молібдатів у солянокислому середовищі можуть утворюватися хлоркомплекси типу $\text{K}_2[\text{MoCl}_5]^-$, $\text{K}_2[\text{MoO}_2\text{Cl}_3]^-$ або $\text{K}_3[\text{MoCl}_6]$. Роданідний комплекс за цих умов утворюється повільно; максимум у спектрі поглинання відповідає не 320 нм (роданідний комплекс), а 294 нм, що характерно для хлоркомплексу. Аналізу заважають іони Fe^{3+} , тому визначенню молібдену повинно передувати або осадження заліза у вигляді полуторних оксидів, або зв'язування його у комплекс фторидами і відновлення до Fe^{2+} . Другий спосіб більш надійний, оскільки в першому випадку об'ємний осад полуторних оксидів може адсорбувати Мо, призводячи цим до викривлення результатів. За великого вмісту заліза треба додавати більші кількості відновника. Однак надлишок SnCl_2 може відновлювати іони молібдену не до Mo^{5+} , а до більш низьких ступенів окислення. Ці іони також реагують із роданідом, утворюючи безкольорові комплекси, внаслідок чого отримують занижені результати. Для запобігання цьому і стабілізації забарвлення комплексу може бути використаний розчин NH_4NO_3 . Але присутність деякої кількості заліза під час визначення навіть необхідна, оскільки допомагає повному відновленню Mo^{6+} до Mo^{5+} .

Забарвлений молібден-роданідний комплекс розчинний в органічних розчинниках. Раніше для екстракції комплексу зазвичай використовували ізоаміловий спирт або суміш CCl_4 і ізоамілового спирту (1 : 1). Зараз переважно використовують етиловий ефір або менш летючий і токсичний н-бутанол. Органічні екстракти зневоднюють, щоб видалити крапельки води, які викривляють результати визначення. Метод дає змогу визначити вміст Мо в межах 0,1 мкг елемента у пробі.

Перебіг аналізу. 3–5 г повітряно-сухого рослинного матеріалу розміщують у кварцову чашку і озолують у муфелі за температури не вище 500 °С. Якщо використовуються фарфорові чашки і тиглі, необхідно установити, чи не міститься молібден у глазурі. Використання платинового посуду не рекомендується, оскільки хлорплатинатний комплекс дає яскраве забарвлення і переходить в органічні розчинники. Якщо зола містить велику кількість карбонатів (зола бобових рослин) або силікатів, її змочують кількома краплями (до 1 мл) концентрованої HNO_3 , випарюють і прогрівають у муфелі протягом 30 хв. До охолодженої золи доливають 10 мл 22 % HCl , накривають годинниковим склом і кип'ятять 10 хв. Осад силікатів відокремлюють фільтруванням, розкладають його разом із фільтром і об'єднують із солянокислою зольною витяжкою; далі переносять у колбу ємністю 25 мл. Якщо зразки містять мало заліза, додають FeCl_3 до кінцевої концентрації приблизно 0,1 мг в 1 мл розчину і доводять до мітки водою.

10–15 мл витяжки зі вмістом Мо приблизно 0,5 мкг (краще більше) приміщують у мірчу колбу об'ємом 25 мл. Доливають туди 2,5 мл 20 % HCl , 1,5 мл 5 % розчину NH_4F , 2,5 мл 20 % розчину NaNO_3 і доводять розчин до мітки бі-

дистилятом. 20 мл цього розчину переносять у ділільну лійку, додають туди 2 мл 20 % розчину роданіду і вміст лійки перемішують. Доливають у лійку 1,5 мл 10 % розчину SnCl_2 і енергійно струшують; червоно-буре забарвлення роданіду тривалентного заліза зникає. Після цього в лійку доливають 10 мл бутанолу, який насичений SnCl_2 , і енергійно струшують протягом 1 хв. Після розшарування рідини нижній водний шар відкидають, бутаноловий шар промивають 20 мл 1 % розчину SnCl_2 для видалення слідів Fe^{3+} . Розчин не повинен мати рожевого відтінку; інакше треба ще раз додати розчин SnCl_2 . Якщо розчин мутний від дрібних крапель води, додають 1 мл етанолу і струшують. Через 20–30 хвилин вимірюють оптичну густину розчину за довжини хвиль 463 нм на спектрофотометрі або на фотоелектроколометрі за синім світлофільтром. В останньому випадку використовують кювети з більшою довжиною оптичного шляху (3 см).

Побудова калібрувального графіка

Для побудови калібрувального графіка (0,2–5 мкг Мо у пробі) до стандартних розчинів молібдату амонію додають залізо в кількостях, які зазвичай присутні в золі рослин. Під час визначення молібдену в рослинах за умови дефіциту заліза деяку його кількість вносять і в контрольні зразки. Для побудови калібрувального графіка молібдат амонію перекристалізують. Для цього кілька грамів солі розчиняють у витяжній шафі під час нагрівання в концентрованому розчині аміаку, фільтрують через лійку з підігрівом, охолоджують і осаджують 5 об'ємами етанолу. Осад, що випадає, відокремлюють на лійці Бюхнера, промивають спиртом і висушують між листами фільтрувального паперу. 5–6 г перекристалізованого молібдату в фарфоровому тиглі прожарюють у муфелі за температури 450 °C протягом 1 год. Після охолодження 1,5 г отриманого MoO_3 розчиняють у 10 мл 1 N NaOH, додають 10 мл 20 % HCl і доводять об'єм водою до 1 л. Такий розчин містить 1 мг Мо в 1 мл. Для отримання робочих розчинів запасний розчин розводять водою. Для отримання точного титру 20 мл запасного розчину підкислюють 5 мл 10 % CH_3COOH , доводять об'єм до 100 мл, нагрівають до 90 °C, додають 3 мл 5 % розчину NH_4NO_3 і поступово доливають 4 % розчин $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$ до припинення утворення осаду молібдату свинцю, додають ще кілька крапель $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$ (для перевірки повноти осадження) і фільтрують через паперовий фільтр. Фільтр з осадом прожарюють у муфелі у зваженому тиглі за температури 450 °C протягом 40 хв; осад зважують. Точний вміст Мо в 1 мл запасного розчину отримують множенням маси осаду на 0,2614.

Обладнання

1) кварцова чашка для спалювання; 2) муфельна піч; 3) мірчі колби об'ємом 25 мл; 4) ділільні лійки; 5) спектрофотометр або фотоелектроколометр.

Реактиви

1) азотна кислота (HNO_3) концентрована; 2) соляна кислота (HCl) 20 % та 22 % розчини; 3) хлорид заліза (FeCl_3); 4) фторид амонію (NH_4F) 5 % розчин;

5) нітрат натрію (NaNO_3) 20 % розчин; 6) хлорид олова (SnCl_2) 10 % та 1 % розчин; 7) бутанол ($\text{C}_4\text{H}_9\text{OH}$); 8) етанол ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$); 9) молібдат амонію ($(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$) для калібрувального графіка; 10) гідроксид натрію (NaOH) 1 N розчин; 11) оцтова кислота (CH_3COOH) 10 % розчин; 12) нітрат амонію (NH_4NO_3) 5 % розчин; 13) ацетат свинцю ($(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$) 4 % розчин.

Приготування реактивів

Реактив № 6. 10 % розчин хлориду олова готують із хімічно чистої солі. Для цього 10 г солі під час нагрівання розчиняють у 20 мл 22 % HCl , у розчин додають на кінчику скальпеля порошок металевого олова, покривають склянку годинниковим склом, нагрівають 10–15 хв на бані і доводять об'єм до 100 мл. Якщо хімічно чиста сіль хлориду олова відсутня, 6–7 г олова розплавляють у фарфоровій чашці і розтирають фарфоровим товчачиком до утворення дрібного порошку; 5,3 г порошку зважують і розчиняють під час нагрівання у 20 мл 22 % HCl . Об'єм доводять водою до 100 мл.

Реактив № 7. Н-бутанол промивають у ділильній лійці таким самим об'ємом води. Після розшарування шарів нижній водний шар видаляють, а бутанол струшують 3–5 хвилин з 0,1 об'єму 10 % розчину SnCl_2 ; далі додають 5 мл етанолу на кожні 100 мл бутанолу, перемішують розчин та використовують для екстракції.

ПИТАННЯ ДЛЯ ПЕРЕВІРКИ ЗНАНЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Яке значення у життєдіяльності рослин відіграє молібден? До якої групи елементів мінерального живлення він належить?
2. Охарактеризуйте принцип методу визначення молібдену роданідним методом у рослинному матеріалі.
3. Які іони заважають визначенню молібдену? Як уникнути утворення солей з іншим ступенем окислення молібдену?
4. Наведіть етапи виконання аналізу.
5. Охарактеризуйте методику побудови калібрувального графіка. Для чого він використовується під час визначення молібдену у рослинах?
6. Які особливості приготування реактивів у цьому методі? Як проводиться їх очистка?

РОБОТА 5.23. ВИЗНАЧЕННЯ МОЛІБДЕНУ КІНЕТИЧНИМ МЕТОДОМ ЗА ПАНТАЛЕРОМ

Принцип методу. Метод оснований на каталітичній дії слідів молібдену на окислення рубеановодневої кислоти ($\text{C}_2\text{H}_4\text{N}_2\text{S}_2$) пероксидом водню. Внаслідок реакції утворюються забарвлені продукти окислення. Їх екстинція за визначених умов пропорційна до концентрації молібдену у пробі. Визначенню молібдену

цим методом не заважають фосфати, пірофосфати, фториди. Залізо зменшує швидкість реакції, тому його зв'язують додаванням комплексону. Іони Cu^{2+} у великих концентраціях перешкоджають визначенню. Чутливість методу становить до 0,01 мкг Мо в 1 мл розчину. Оскільки вміст молібдену у тканинах малий, наявка матеріалу повинна бути великою (2–4 г).

Перебіг аналізу. Золю розчиняють у 10 мл 6 N HCl, переносять у ділильну ліжку і додають 2–3 краплі свіжої хлорної води для окислення заліза і молібдену. Іони Mo^{6+} і Fe^{3+} екстрагують в ефір, для чого в ділильну ліжку додають 15 мл перегнаного діетилового ефіру, струшують і через 2 хв відокремлюють ефірний шар. Операцію повторюють 2 рази. Об'єднану ефірну фракцію примішують у склянку або чашку для випарювання і відганяють ефір під тягою на бані з гарячою водою. Сухий залишок нагрівають із 5 мл 0,5 N HCl і 1 мл розведеної H_3PO_4 протягом 30 хв. Розчин кількісно переносять водою в мірчу колбу об'ємом 25 мл. Додають у колбу 2 мл 0,04 М розчину комплексону для зв'язування іонів заліза, 5 мл розчину рубеоноводневої кислоти і примішують на 15 хв у термостат за температури 20 °С. Розчин комплексону містить 1,485 г двонатрієвої солі ЕДТА у 100 мл розчину.

Безпосередньо перед початком вимірювань додають 1 мл 0,05 М розчину H_2O_2 , доливають до мітки, перемішують і визначають оптичну густину розчину через 5 і 30 хв після додавання H_2O_2 за довжини хвилі 428 нм проти води. Якщо оптична густина розчину невелика, беруть кювети з великою довжиною оптичного шляху (2–5 см). Різницю отриманих величин оптичної густини використовують для визначення вмісту Мо. Оскільки іони заліза, незважаючи на зв'язування їх комплексоном, також каталізують цю реакцію, і цим можуть впливати на точність визначення, необхідно поставити ще «сліпий» контроль, у який вносять залізо у кількості, що приблизно дорівнює вмісту у зразках. Цей контроль обробляють, використовуючи ту саму процедуру. Під час аналізу великих серій зразків із великими коливаннями у вмісті заліза готують 2–3 «сліпі» контролю. Отримані оптичні густини враховують для розрахунків. Для точних визначень необхідно робити поправку і на іони міді, оскільки деяка їх кількість також переходить із водної фази в ефір.

Побудова калібрувального графіка

Стандартні розчини для побудови калібрувального графіка (0,3–1,2 мкг Мо у 1 мл) обробляють аналогічним до дослідних зразків способом.

Обладнання

1) ділильні ліжки; 2) склянки або чашки для випарювання; 3) мірчі колби об'ємом 25 мл; 4) спектрофотометр.

Реактиви

1) соляна кислота (HCl) 6 N та 0,5 N розчини; 2) діетиловий ефір; 3) фосфорна кислота (H_3PO_4) розведений розчин; 4) етилендіамінтетраоцтова кислота (ЕДТА, комплексон $(\text{HOOCCH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})$ 0,04 M розчин; 5) рубеоноводнева кислота $(\text{NH}_2\text{C}(\text{S})\text{C}(\text{S})\text{NH}_2)$ 0,02 M розчин; 6) пероксид водню (H_2O_2) 0,05 M розчин.

Приготування реактивів

Реактив № 3. 5 мл 85 % H_3PO_4 вносять у мірчу колбу об'ємом 1 000 мл і доводять об'єм дистильованою водою до 1 л.

Реактив № 5. Для приготування 0,02 M розчину рубеоноводневої кислоти 60 мг її розчиняють у 200 мл води, швидко нагрівають до кипіння, охолоджують і доводять об'єм до 250 мл.

ПИТАННЯ ДЛЯ ПЕРЕВІРКИ ЗНАТЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Яке значення у життєдіяльності рослин відіграє молібден? До якої групи елементів мінерального живлення він належить?
2. Охарактеризуйте принцип методу визначення молібдену у рослинному матеріалі кінетичним методом.
3. Які іони заважають визначенню молібдену?
4. Наведіть етапи виконання аналізу.
5. Які особливості приготування реактивів у цьому методі? Як проводиться їх очистка?

РОБОТА 5.24. ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ІОНІВ ФТОРУ У РОСЛИННОМУ МАТЕРІАЛІ ІОН-СЕЛЕКТИВНИМ МЕТОДОМ (ЗА J. S. JACOBSON ТА L. I. HELLER)

Фториди невластиві для рослинних організмів і тому не належать до необхідних для життєдіяльності елементів мінерального живлення. Лише рослини камелії та чаю здатні накопичувати з ґрунту значні кількості фторид-іону. Для інших видів рослин проникнення фторидів у клітини спричиняє порушення фізіологічних функцій.

Принцип методу. Концентрація фторидів у рослинному матеріалі визначається за допомогою іон-селективного електрода. Такі електроди містять мембрану із фториду лантану, активованого європієм, яка дає змогу визначити електро рушійну силу іонів фтору незалежно від наявності у розчині інших іонів. Метод швидкий і дає відтворювані результати. Чутливість методу залежно від типу електроду коливається від 1×10^{-4} до 1×10^{-5} моль/л.

Перебіг аналізу. Для визначення вмісту фторидів рослинний матеріал висушується в термостаті за температури 80 °C протягом 48 год. Висушений мате-

ріал подрібнюється за допомогою гомогенізатора. Із подрібненого рослинного матеріалу відбирається наважка масою 1 г. Підготований у такий спосіб матеріал приміщується у поліетиленову склянку і до нього додається 1–3 мл етанолу. До підготованого в такий спосіб матеріалу, що містить фторид-іон, додається 10 мл 0,05 N сірчаної кислоти. Склянку приміщують на магнітну мішалку і проводять екстракцію протягом 20 хв. Далі до суміші додають 20 мл 0,1 N розчину гідроксиду натрію і екстракція продовжується за постійного перемішування на магнітній мішалці ще 20 хв. Після закінчення екстракції надлишок лугу нейтралізується додаванням 10 мл 0,05 N сірчаної кислоти. Для полегшення виходу іонів фтору у розчин перед вимірюванням у гомогенат додається 5 мл 0,1 N цитрату натрію тризаміщеного. рН отриманого гомогенату підтримується додаванням розчину 0,05 N ацетату натрію, рН якого доводиться до 7,0 за допомогою 0,05 N оцтової кислоти. Визначення концентрації фторид-іонів проводиться в отриманому гомогенаті за умови перемішування на магнітній мішалці. Для вимірів застосовується фторидний іон-селективний електрод, який приєднується до мілівольтметра (рН-метр або іономір). Розрахунки концентрації фторид-іонів проводяться за калібрувальним графіком.

Обладнання

1) фторидний іон-селективний електрод; 2) рН-метр або іономір; 3) магнітна мішалка; 4) поліетиленові склянки ємністю 100 мл; 5) мірчі піпетки на 5 та 10 мл; 6) аналітичні терези; 7) сушильна шафа або термостат; 8) гомогенізатор.

Реактиви

1) етанол (C_2H_5OH) 96 %; 2) сірчана кислота (H_2SO_4) 0,05 N розчин; 3) гідроксид натрію ($NaOH$) 0,1 N розчин; 4) цитрат натрію ($Na_3C_6H_5O_7 \cdot 5,5H_2O$) 0,1 N розчин; 5) ацетат натрію (CH_3COONa) 0,05 N розчин; 6) оцтова кислота (CH_3COOH) 0,05 N розчин; 7) фторид натрію (NaF) хімічно чистий.

ПИТАННЯ ДЛЯ ПЕРЕВІРКИ ЗНАНЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Наведіть характеристику фтору. Яке значення фториди мають для рослин?
2. Охарактеризуйте значення фторидів для тварин та людини. До чого призводить надлишкове потрапляння фторидів в організм?
3. Охарактеризуйте принцип методу визначення фторид-іонів за допомогою іон-селективних електродів.
4. Наведіть переваги та недоліки цього методу аналізу.
5. Які ще речовини можна визначати за допомогою іон-селективного аналізу? Наведіть приклади.

6. АНАЛІЗ ВУГЛЕВОДІВ У РОСЛИНАХ

РОБОТА 6.1. ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ РЕДУКУЮЧИХ ЦУКРІВ (ЗА МЕТОДОМ БЕРТРАНА)

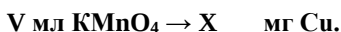
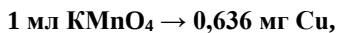
Принцип методу. Метод оснований на здатності редукуючих цукрів, які мають вільну карбонільну групу, відновлювати у лужному розчині оксидну мідь до закисної. Сахароза та інші олігоцукри, у яких обидві карбонільні групи (сахароза) або одна з них (мальтоза) зв'язані, потребують попереднього гідролізу кислотою або ферментом. Завдання полягає у визначенні кількості осаду закису міді, який утворився під час взаємодії з цукрами. Ця кількість точно відповідає кількості цукрів, що знаходяться у розчині. Для цього осад закису міді розчиняють сірчанокислим оксидним залізом у присутності сірчаної кислоти. У процесі розчинення закис міді окислюється тривалентним залізом, яке відновлюється до двовалентного заліза (Fe^{2+}). Останнє кількісно окислюється у процесі титрування перманганатом калію.

Перебіг аналізу. Наважку (1–2 г) свіжого рослинного матеріалу ретельно подрібнюють та переносять за допомогою гарячої дистильованої води у мірчу колбу об'ємом 100 мл. У цю саму колбу додають 50–60 мл гарячої води і ставлять на водяну баню з температурою 80–90 °С. Екстракцію цукрів із рослинного матеріалу проводять протягом 1 години за умови періодичного струшування розчину. Колбу охолоджують і в розчині осаджують білки, додаючи 5 мл 10 % розчину ацетату свинцю. Вміст колби перемішують і об'єм рідини доводять водою до 100 мл. Рідину фільтрують через паперовий фільтр у суху колбу. Беруть 50 мл фільтрату у мірчу колбу на 100 мл, додають 3–5 мл насиченого розчину сульфату натрію для видалення надлишку свинцю. Розчин у колбі перемішують і доводять об'єм дистильованою водою до 100 мл. Фільтрат використовують для визначення цукрів.

Беруть 10 мл фільтрату у конічну колбу об'ємом 100 мл, додають 10 мл 4 % розчину $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ та 10 мл лужного розчину сегнетової солі. Після цього вміст колби доводять до кипіння та кип'ятять 3 хв. За цих умов відбувається взаємодія редукуючих цукрів із фелінговою рідиною і випадає червоний осад закису міді. Після охолодження рідину фільтрують через фільтр Шотта, з'єднаний із колбою Бунзена, з якої за допомогою насоса Камовського відкачується повітря. Фільтрат, який знаходиться у колбі Бунзена, виливається, а осад на скляному фільтрі (фільтрі Шотта) розчиняють, додаючи 5 мл розчину сульфату закисного заліза та обережно перемішуючи його скляною паличкою. Якщо осад не повністю розчинився, додають ще 5 мл сульфату закисного заліза. Отриманий розчин фільтрують у колбу Бунзена. Після розчинення Cu_2O рідину зливають у конічну колбу для титрування і додають 2 мл 85 % H_3PO_4 для видалення жовтого забарв-

лення, яке обумовлене наявністю іонів Fe^{3+} (Fe^{3+} із H_3PO_4 утворюють безбарвний комплекс, і тоді більш чітко виявляється рожеве забарвлення під час титрування). Розчин титрують із мікробюретки 0,01 N розчином перманганату калію до виникнення рожевого забарвлення, яке не зникає протягом 1 хвилини (час відлічують секундоміром). Якщо забарвлення зникає менш ніж через хвилину, необхідно додати ще розчину KMnO_4 і знову почати відлік часу. Паралельно ведуть контрольне титрування. Для цього використовують усі реактиви, як і під час проведення досліду, але замість витяжки з рослинного матеріалу беруть дистильовану воду.

Обчислення результатів. З огляду на те, що 1 мл 0,01 N розчину перманганату калію відповідає 0,636 мг міді, розраховують кількість міді, яка була отримана в реакції відновлення між фелінговою рідиною і цукрами. Для цього складають пропорцію:



Далі в таблиці Бертрана (табл. 6д) знаходять кількість мг глюкози, яка відповідає кількості мг міді, і розраховують вміст цукрів у рослинному матеріалі за такою формулою:

$$x = \frac{a \times V \times 100}{V_1 \times n},$$

де:

x – вміст цукрів у рослинному матеріалі, %;

a – кількість цукрів в об'ємі витяжки V_1 , знайдена в таблиці Бертрана;

V – об'єм витяжки, отриманий із наважки, мл,

V_1 – об'єм витяжки, взятий для визначення цукрів, мл;

n – наважка рослинного матеріалу, г.

Визначення вмісту сахарози

Для визначення вмісту в рослинному матеріалі сахарози відбирають 25 мл витяжки, яка залишилася після визначення редуруючих цукрів, у мірчу колбу об'ємом 50 мл. У другу колбу наливають 25 мл води і занурюють у неї термометр. Обидві колби ставлять у водяну баню з температурою 80 °С. Коли температура в колбі з водою досягне 70 °С, у дослідну колбу додають 1,5 мл концентрованої соляної кислоти. Гідроліз цукрів ведуть протягом 6 хв за температури 70 °С. Після гідролізу розчин охолоджують холодною водою, додають 2–3 краплі метилового червоного і нейтралізують 4 % розчином NaOH . Після нейтралізації об'єм розчину доводять водою до 50 мл і визначають у ньому цукри за Бертраном (як було описано в попередньому розділі). Під час обчислення результатів треба враховувати розведення розчину.

Обладнання

1) водяна баня; 2) піпетки на 1, 5 та 10 мл; 3) колба Бунзена; 4) фільтр Шотта № 3 або № 4; 5) мірчі колби об'ємом 50 та 100 мл; 6) конічні колби об'ємом 100 мл; 7) лійки; 8) паперові фільтри; 9) електрична плита; 10) бюретка для титрування; 11) термометр; 12) ступка з товкачиком.

Реактиви

1) сульфат міді ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 4 % розчин; 2) калій-натрій тартрат ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, сегнетова сіль) лужний розчин; 3) сульфат заліза закисного ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$) 5 % розчин; 4) сірчана кислота концентрована (густина 1,84 г/мл); 5) перманганат калію (KMnO_4) 0,01 N розчин (готується з фіксаналу); 6) гідроксид натрію (NaOH) 4 % розчин; 7) соляна кислота (HCl) концентрована; 8) метиловий червоний 0,1 % розчин у воді; 9) ацетат свинцю ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COOH})_2$) 10 % розчин; 10) сульфат натрію (Na_2SO_4) насичений розчин; 11) ортофосфорна кислота (H_3PO_4) концентрована.

Приготування реактивів

Реактив № 2 (лужний розчин сегнетової солі). 200 г сегнетової солі (калій-натрій тартрат) розчиняють у 500 мл дистильованої води і додають в розчин 150 г NaOH . Отриманий розчин переносять у мірчу колбу об'ємом 1 л і доводять його об'єм до 1 л.

Реактив № 3 (розчин сульфату заліза закисного). 50 г сульфату заліза закисного ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$) розчиняють у 300 мл дистильованої води, додають 108,70 мл сірчаної кислоти густиною 1,84 г/мл, доводять об'єм розчину до 1 л у мірчій колбі.

ПИТАННЯ ДЛЯ ПЕРЕВІРКИ ЗНАНЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Дайте характеристику редукуючих цукрів (хімічна будова, функції у рослинах).
2. Дайте характеристику принципу методу визначення кількості редукуючих цукрів за Бертраном.
3. Що таке фелінгова рідина (хімічний склад, призначення в методиці)?
4. Які хімічні перетворення відбуваються під час додавання до осаду міді розчину сульфату закисного заліза?
5. Яка залежність існує між вмістом редукуючих цукрів у фільтраті та кількістю розчину перманганату калію, яка витрачається на титрування? Поясніть.
6. Чому поява рожевого забарвлення свідчить про завершення титрування?
7. У чому полягає відмінність визначення редукуючих цукрів та визначення сахарози за методом Бертрана?
8. Чому під час визначення сахарози після кислотного гідролізу витяжки необхідна нейтралізація отриманого розчину лугом?

9. Яка речовина вступає у взаємодію з перманганатом калію у процесі титрування?

РОБОТА 6.2. КОЛОРИМЕТРИЧНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ РЕДУКУЮЧИХ ЦУКРІВ (ЗА ПРИСЕДСЬКИМ ТА НІЩЕНКО)

Принцип методу. Спосіб визначення вмісту редукуючих цукрів у рослинному матеріалі полягає в утворенні оксиду міді під час взаємодії цукрів із мідно-лужним реактивом. Отриманий осад відділяють за допомогою фільтрування через скляний фільтр № 3 (пор. 40) або № 4 (пор. 16), розчиняють у нагрітому до 35–37 °С насиченому розчині хлориду амонію, визначають оптичну густину розчину утвореної комплексної солі на спектрофотометрі за довжини хвилі 590 нм та розраховують концентрацію та вміст редукуючих цукрів у рослинному матеріалі.

Перебіг аналізу. Наважка (1–2 г) свіжого рослинного матеріалу ретельно подрібнюється та переноситься за допомогою гарячої дистильованої води у мірчу колбу об'ємом 100 мл. У цю саму колбу додають 50–60 мл гарячої води і ставлять на водяну баню з температурою 80–90 °С. Екстракцію цукрів із рослинного матеріалу ведуть протягом 1 год за умови періодичного струшування розчину. Колбу охолоджують і в розчині осаджують білки, додаючи 5 мл 10 % розчину ацетату свинцю. Вміст колби перемішують і об'єм рідини доводять водою до 100 мл. Рідину фільтрують через паперовий фільтр у суху колбу. Беруть 50 мл фільтрату у мірчу колбу на 100 мл, додають 3–5 мл насиченого розчину сульфату натрію для видалення надлишку свинцю. Розчин у колбі перемішують і доводять об'єм дистильованою водою до 100 мл. Фільтрат використовують для визначення цукрів.

Беруть 10 мл фільтрату у конічну колбу на 100 мл, додають 10 мл 4 % розчину $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ та 10 мл лужного розчину сегнетової солі. Після цього вміст колби доводять до кипіння та кип'ятять 3 хв. За цих умов відбувається взаємодія редукуючих цукрів з фелінговою рідиною та випадає червоний осад закису міді. Після охолодження рідину фільтрують через фільтр Шотта № 3 або № 4, з'єднаний із колбою Бунзена, з якої за допомогою вакуумного насоса відкачується повітря. Фільтрат, який знаходиться у колбі Бунзена, виливається, а осад на скляному фільтрі промивають дистильованою водою до зникнення забарвлення промивної води. Мідно-лужний реактив та промивну воду зливають і ретельно промивають колбу для фільтрування. Далі на фільтрі осад обробляють нагрітим до 35–40° С насиченим розчином хлориду амонію (розчинність 35–37,2 г/100 мл). Об'єм отриманого розчину комплексної мідної солі доводять до 10 мл, після чого вимірюють оптичну густину на спектрофотометрі за довжини хвилі 590 нм. Концентрацію цукру обчислюють за формулою:

$$C_{\text{досл}} = \frac{C_{\text{станд}} \times D_{\text{досл}}}{D_{\text{станд}}},$$

де:

$C_{\text{досл}}$ – концентрація цукру у дослідному розчині (мг/мл);

$C_{\text{станд}}$ – концентрація цукру у стандартному розчині (мг/мл);

$D_{\text{досл}}$ – оптична густина дослідного розчину;

$D_{\text{станд}}$ – оптична густина стандартного розчину.

Вміст цукрів у рослинному матеріалі обчислюють за формулою:

$$A = \frac{C \times V}{n},$$

де:

A – вміст цукру у рослинному матеріалі, мг/г;

C – концентрація цукрів, обчислена за формулою [1], мг/мл;

V – об'єм витяжки, мл;

n – наважка рослинного матеріалу, г.

Обладнання

1) водяна баня; 2) піпетки на 1, 5 та 10 мл; 3) колба Бунзена; 4) фільтр Шотта № 3 або № 4; 5) мірчі колби об'ємом 50 та 100 мл; 6) конічні колби об'ємом 100 мл; 7) лійки; 8) електрична плита; 9) термометр; 10) ступка з товкачиком; 11) спектрофотометр.

Реактиви

1) сульфат міді ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 4 % розчин; 2) сегнетова сіль (калій-натрій тарtrat, $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) лужний розчин; 3) гідроксид натрію (NaOH) 4 % розчин; 4) ацетат свинцю ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$) 10 % розчин; 5) сульфат натрію (Na_2SO_4) насичений розчин; 6) хлорид амонію (NH_4Cl) насичений розчин; 7) стандартний розчин глюкози.

Приготування реактивів

Реактив № 2. Лужний розчин сегнетової солі: 200 г сегнетової солі (калій-натрій тарtrat) розчиняють у 500 мл дистильованої води і додають в розчин 150 г NaOH . Отриманий розчин переносять у мірчу колбу об'ємом 1 л і доводять його об'єм до 1 л.

Реактив № 7. Стандартний розчин глюкози: 100 мг глюкози розчиняють у 50–60 мл води, переносять у мірчу колбу та доводять об'єм рідини до 100 мл. Цей розчин містить 1 мг/мл глюкози. Із нього готують розчин, що містить 0,5 мг/мл шляхом розведення дистильованою водою.

ПИТАННЯ ДЛЯ ПЕРЕВІРКИ ЗНАНЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Дайте характеристику редукуючих цукрів (хімічна будова, функції у рослинах).

2. Дайте характеристику принципу методу визначення кількості редуруючих цукрів фотометричним методом.

3. Які хімічні перетворення відбуваються під час додавання до осаду міді розчину хлориду амонію?

РОБОТА 6.3. ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ГЛЮКОЗИ ЗА ДОПОМОГОЮ ГЛЮКОЗООКСИДАЗИ

Принцип методу. Метод оснований на здатності глюкозооксидази окислювати глюкозу до глюконової кислоти, яка дає рожеве забарвлення у присутності 4-амінофенозону та фенолу. Інтенсивність забарвлення вимірюється на спектрофотометрі або фотоелектроколориметрі. Фермент глюкозооксидаза має високу специфічність до глюкози, що сприяє високій точності визначення вмісту саме цього цукру. Інші цукри під час використання цього методу не заважають визначенню.

Перебіг аналізу. Наважка (1–2 г) свіжого рослинного матеріалу ретельно подрібнюється та переноситься за допомогою гарячої дистильованої води у мірчу колбу об'ємом 100 мл. У цю саму колбу додають 50–60 мл гарячої води і ставлять на водяну баню з температурою 80–90 °С. Екстракцію цукрів із рослинного матеріалу ведуть протягом 1 год за умови періодичного струшування розчину. Колбу охолоджують і в розчині осаджують білки, додаючи 5 мл 10 % розчину ацетату свинцю. Вміст колби перемішують і об'єм рідини доводять водою до 100 мл. Рідину фільтрують через паперовий фільтр у суху колбу. Беруть 50 мл фільтрату у мірчу колбу на 100 мл, додають 3–5 мл насиченого розчину сульфату натрію для видалення надлишку свинцю. Розчин у колбі перемішують і доводять об'єм дистильованою водою до 100 мл. Фільтрат використовують для визначення глюкози.

Для визначення використовують набір для визначення глюкози глюкозооксидазним (GOD-PAP) методом з біореагентами (ПрАТ «Реагент», м. Дніпро). Для цього готують робочий реагент, змішуючи реактив № 4 та реактив № 5 у співвідношенні 1 : 1. Далі у пробірки додають 2 мл робочого реагенту, 0,02 мл розчину глюкози, ретельно перемішують і ставлять до термостату з температурою 37 °С на 12 хв. Паралельно готують калібрувальний розчин, який містить 2 мл робочого реагенту та 0,02 мл стандартного розчину глюкози (реактив № 3), який також ставлять до термостату. Як контроль (порівняльного зразка) для вимірювання оптичної густини використовують суміш робочого реагенту та дистильованої води (2 мл реагенту та 0,02 мл H₂O). Вимірювання оптичної густини ведуть за довжини хвилі 540 нм. Розрахунки концентрації глюкози ведуть за формулою:

$$C = \frac{E_{\text{досл}}}{E_{\text{станд}}} \times C_{\text{станд}},$$

де:

C – концентрація глюкози, мл/л;

$E_{\text{досл}}$ – оптична густина дослідного розчину;

$E_{\text{станд}}$ – оптична густина стандартного розчину;

$C_{\text{станд}}$ – концентрація стандартного розчину, мг/л.

Для розрахунку вмісту цукрів у наважці застосовують формулу:

$$X = \frac{C \times V}{n \times 1\,000}$$

де:

X – вміст глюкози, мг/г;

C – концентрація глюкози у витяжці, мг/л;

V – об'єм витяжки, мл;

n – наважка рослинного матеріалу, г;

$1\,000$ – коефіцієнт перерахунку об'єму.

Обладнання

1) фарфорові ступки з товкачиками; 2) конічні колби об'ємом 100 мл; 3) мірчі колби об'ємом 100 мл; 4) піпетки об'ємом 2 та 0,2 мл; 5) пробірки; 6) спектрофотометр з кюветами.

Реактиви

1) ацетат свинцю ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$) 10 % розчин; 2) сульфат натрію (Na_2SO_4) насичений розчин; 3) глюкоза ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) стандартний розчин 2 мг/л; 4) фосфатний буфер рН 7,4 (реагент № 1); 5) розчин глюкозооксидази (реагент № 2).

Приготування реактивів

Реактив № 3 (стандартний розчин глюкози). Наважку глюкози 20 мг розчиняють у 50 мл дистильованої води та доводять об'єм у мірчій колбі до 100 мл.

Склад реагентів

Реагент № 1. 0,1 М фосфатний буфер рН 7,4, який містить 188,22 мг фенолу в 1 л розчину.

Реагент № 2. Глюкозооксидаза – 18 000 од./л; пероксидаза – 18 000 од./л; 4-амінофеназон 0,55 ммоль/л (111,65 мг/л).

ПИТАННЯ ДЛЯ ПЕРЕВІРКИ ЗНАНЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Як утворюється глюкоза у рослинах?
2. У яких процесах рослинних організмів бере участь глюкоза?
3. Охарактеризуйте принцип методу визначення глюкози у рослинах.
4. Наскільки специфічний цей метод аналізу і чи заважають визначенню інші моносахариди?

РОБОТА 6.4. АНТРОНОВИЙ МЕТОД ВИЗНАЧЕННЯ ЦУКРІВ ТА КРОХМАЛЮ

Принцип методу. Антроновий реактив утворює синьо-зелене забарвлення з усіма розчинними цукрами, які в однаковій концентрації дають забарвлені розчини практично однакової оптичної густини. Метод дає змогу визначати цукри та крохмаль у невеликих концентраціях (до 0,2 мг у пробі) та придатний для аналізу вегетативних органів.

Перебіг аналізу. Для визначення розчинних цукрів та крохмалю потрібно використовувати окремі наважки та проводити додаткове визначення.

Визначення розчинних цукрів

Беруть наважку 1 г подрібненого свіжого рослинного матеріалу (листя, коренеплідів, плодів), переносять у мірчу колбу об'ємом 100 мл. У колбу наливають 80 мл води і проводять екстракцію цукрів протягом 1 год за періодичного струшування. Після цього розчин освітлюють, додаючи 1 мл розчину сульфату цинку та жовтої кров'яної солі. Об'єм розчину в колбі доводять до 100 мл дистильованою водою. Беруть 3 пробірки, в які вносять по 3 мл антронового реактиву та по 1 мл витяжки. За контроль беруть 3 пробірки, в яких міститься по 3 мл антронового реактиву та по 1 мл дистильованої води. Усі пробірки швидко струшують і ставлять у киплячу водяну баню на 7 хв. Після кип'ятіння пробірки з розчинами охолоджують до кімнатної температури і визначають оптичну густину синьо-зеленого забарвлення на фотоколориметрі за червоним світлофільтром проти контрольної проби. Кількість цукрів визначають за допомогою калібрувального графіка.

Обчислення ведуть за формулою:

$$x = \frac{C \times V \times 100}{n},$$

де:

C – кількість цукрів, знайдена за калібрувальним графіком;

V – загальний об'єм екстракту, мл;

n – наважка рослинного матеріалу, г.

Визначення суми цукрів

Беруть таку саму наважку рослинного матеріалу, як і під час визначення розчинних цукрів, переносять у мірчу колбу на 100 мл. У колбу додають 50 мл 0,5 % розчину сірчаної кислоти і проводять гідроліз на киплячій водяній бані протягом 15 хв. За цих умов відбувається гідроліз крохмалю. Далі додають по 2 мл 30 % розчину сульфату цинку та 15 % розчину жовтої кров'яної солі для освітлення розчину. Доводять об'єм витяжки до 100 мл і фільтрують.

Беруть 3 пробірки і в кожную доливають по 3 мл антронового реактиву і по 1 мл фільтрату. Контроль готується як і для визначення розчинних цукрів (3 мл

антронового реактиву та 1 мл дистильованої води). Усі пробірки струшують і ставлять у киплячу водяну баню на 7 хв. Подальше виконання роботи аналогічне визначенню розчинних цукрів.

Після проведення цього аналізу буде визначена сума розчинних цукрів та крохмалю. Для визначення вмісту крохмалю треба від сумарного вмісту цукрів відняти вміст розчинних цукрів і отримане значення помножити на 0,9.

Побудова калібрувального графіка

Готують 0,02 % розчин глюкози. Цей розчин за допомогою піпетки об'ємом 1 мл вносять у чисті сухі пробірки в кількості 0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9 та 1 мл. У кожну пробірку додають дистильовану воду в такій кількості, щоб загальний об'єм розчину у відповідній пробірці складав 1 мл. Далі у пробірки додають по 3 мл антронового реактиву. Контролем буде пробірка, яка містить 1 мл дистильованої води та 3 мл антронового реактиву. Пробірки струшують, ставлять у киплячу водяну баню та нагрівають протягом 7 хв. Далі пробірки швидко охолоджують до кімнатної температури і густину синьо-зеленого забарвлення визначають на фотоелектроколориметрі за червоним світлофільтром проти контролю. За даними вимірювання оптичної густини будують калібрувальний графік. Для цього на осі абсцис відкладають вміст цукру в мг/мл, а на осі ординат – оптичну густину розчину.

Треба враховувати, що на сонячному світлі забарвлення з'являється дуже швидко, але і швидко зникає. Тому забарвлені розчини краще тримати в холодній воді (у воду додають лід) на розсіяному світлі.

Обладнання

1) мірчі колби об'ємом 100 мл; 2) пробірки об'ємом 10 мл; 3) піпетки об'ємом 1, 5 та 10 мл; 4) водяна баня; 5) фотоелектроколориметр або спектрофотометр; 6) електрична плита; 7) конічні колби об'ємом 100 мл; 8) ступка з товкачиком.

Реактиви

1) сульфат цинку (ZnSO_4) 30 % розчин; 2) фериціанід калію (жовта кров'яна сіль, $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) 15 % розчин; 3) сірчана кислота (H_2SO_4) 0,5 % розчин; 4) антроновий реактив.

Приготування реактивів

Реактив № 4 (антроновий реактив). Зважують 0,02 г перекристалізованого антрону і розчиняють у концентрованій сірчаній кислоті (марки х. ч.). Після розчинення об'єм розчину доводять сірчаною кислотою до 100 мл. *Реактив дуже чутливий до якості сірчаної кислоти.*

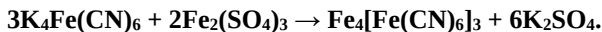
ПИТАННЯ ДЛЯ ПЕРЕВІРКИ ЗНАНЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Дайте характеристику принципу визначення антроновим методом: а) суми цукрів; б) крохмалю.

2. Які цукри належать до групи розчинних цукрів, чим вони відрізняються від редукуючих цукрів?
3. Які цукри входять до суми цукрів?
4. Чи можна за допомогою антронового методу визначити в рослинному матеріалі редукуючі цукри?
5. Чому під час обчислення кількості крохмалю застосовується коефіцієнт 0,9?

РОБОТА 6.5. МІКРОМЕТОД ВИЗНАЧЕННЯ ЦУКРІВ (ЗА ШВЕЦОВОЮ ТА ЛУК'ЯНЕНКО)

Принцип методу. Метод визначення цукрів за методом Швецової та Лук'яненко оснований на відновленні фериціаніду калію редукуючими цукрами у лужному середовищі до фероціаніду. Останній у присутності желатину утворює з сульфатом оксидного заліза стійке синє забарвлення:



Інтенсивність забарвлення вимірюють на фотоелектроколориметрі. Цей метод придатний для масових аналізів. Концентрація цукрів у розчинах може коливатися від 0,01 до 0,1 мг/мл.

Перебіг аналізу. Наважку рослинного матеріалу ($2,5 \pm 0,001$ г) подрібнюють і ретельно розтирають у фарфоровій ступці. Гомогенат кількісно переносять у колбу, додають туди 15–20 мл дистильованої води і нагрівають протягом 1 год за температури 75–80 °С. У гомогенаті осаджують білки та інші речовини, які заважають визначенню, з допомогою 10 % розчину фосфорно-вольфрамової кислоти. Далі у мірці пробірки об'ємом 20 мл додають 2 мл витяжки цукрів, 2 мл лужного розчину гексаціаноферату (III) калію та 2 мл дистильованої води. Рідину у пробірці струшують і нагрівають у киплячій водяній бані протягом 15 хв. Після нагрівання пробірки охолоджують, додають 4 мл розчину сульфату заліза, перемішують і об'єм рідини доводять дистильованою водою до 20 мл. Після ретельного перемішування вимірюють оптичну густину розчинів на фотоелектроколориметрі за червоним світлофільтром у кюветах із товщиною шару 10 мм. Інтенсивність забарвлення зберігається протягом 12 год.

Для визначення суми цукрів у частині екстракту проводять гідроліз, додаючи до кожних 2 мл витяжки цукрів 1 мл 5 % розчину соляної кислоти. Після гідролізу кислоту нейтралізують 5 % лугом, використовуючи як індикатор лакмусовий папір. Подальше виконання роботи аналогічне наведеному в попередньому розділі.

Обчислення ведуть за допомогою калібрувального графіка, який будують, вимірюючи оптичну густину стандартних розчинів, які містять від 0,01 до 0,1 мг/мл глюкози.

Метод дає завищені результати під час аналізу матеріалу з великим вмістом водорозчинних азотистих сполук.

Обладнання

1) конічні колби об'ємом 50 мл; 2) мірчі колби об'ємом 50 мл; 3) мірчі пробірки об'ємом 20 мл; 4) ступки з товкачками; 5) піпетки об'ємом 2 та 10 мл; 6) фотоелектроколориметр або спектрофотометр.

Реактиви

1) соляна кислота (HCl) 5 % розчин; 2) гідроксид натрію або гідроксид калію (NaOH або KOH) 5 % розчин; 3) гексаціаноферат (III) калію ($K_3[Fe(CN)_6]$), червона кров'яна сіль; 4) желатин 10 % розчин; 5) сульфат заліза ($Fe_2(SO_4)_3$); 6) фосфорновольфрамова кислота ($H_3[P(W_3O_{10})_4] \cdot H_2O$) 10 % розчин.

Приготування реактивів

Реактив № 3. 1,65 г гексаціаноферату (III) калію (червоної кров'яної солі) ($K_3[Fe(CN)_6]$) розчиняють у дистильованій воді, додають 10 г карбонату натрію (K_2CO_3) і об'єм розчину доводять дистильованою водою до 1 л.

Реактив № 5 (розчин сульфату заліза). Зважують $1 \pm 0,01$ г сульфату окисного заліза і розчиняють у 10 мл концентрованої сірчаної кислоти (густина 1,84). Об'єм розчину у мірчій колбі доводять до 1 л. Робочий розчин готують у день аналізу, змішуючи 20 об'ємних частин цього розчину з 1 частиною 10 % розчину желатину.

ПИТАННЯ ДЛЯ ПЕРЕВІРКИ ЗНАТЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Наведіть характеристику принципу методу визначення редукуючих цукрів.
2. Для чого розчин сірчаноокислого заліза містить желатин?
3. Як визначити суму цукрів з допомогою цього методу?
4. Які речовини заважають визначенню цукрів і як їх позбутися?
5. Як розрахувати наважку глюкози для побудови калібрувального графіка?

РОБОТА 6.6. ВИЗНАЧЕННЯ ФРУКТОЗИ ТА ІНШИХ КЕТОЦУКРІВ (ЗА МЕТОДОМ МАК-ПЕРІ ТА СЛАТТЕРІ)

Принцип методу. У методі Мак-Пері та Слаттері використовується здатність кетоцукрів утворювати забарвлені розчини за умови взаємодії з резорцином у кислому середовищі.

Перебіг аналізу. Наважку рослинного матеріалу ($2,5 \pm 0,001$ г) подрібнюють і ретельно розтирають у фарфоровій ступці. Гомогенат кількісно переносять в колбу, додають туди 15–20 мл дистильованої води і нагрівають протягом 1 год за температури 75–80 °C. У гомогенаті осаджують білки та інші речовини, які

заважають визначенню, за допомогою 10 % розчину фосфорновольфрамової кислоти. У пробірку піпеткою вносять 1 мл екстракту, який містить від 1 до 8 мг фруктози в 100 мл розчину, 1 мл розчину резорцину у етанолі та 3 мл 30 % розчину соляної кислоти. В іншу пробірку замість екстракту наливають 1 мл дистильованої води та інші реактиви (контрольна проба). Рідину у пробірках ретельно перемішують і нагрівають у водяній бані протягом 20 хв за температури 80 °С. Охолоджують до кімнатної температури і вимірюють оптичну густину на фотоелектроколориметрі за зеленим світлофільтром або на спектрофотометрі (довжина хвилі 540 нм).

Контрольна проба використовується як еталон для порівняння. Обчислення фруктози ведуть з допомогою калібрувального графіка.

Побудова калібрувального графіка

Калібрувальний графік будують на основі вимірів оптичної густини розчинів, які містять від 10 до 100 мкг/мл фруктози. Для цього розчиняють 100 мг фруктози у 100 мл насиченого розчину бензойної кислоти. Робочий розчин готують, змішуючи 4 мл розчину фруктози зі 100 мл дистильованої води. Готують 6 пробірок. У першу наливають 0,1 мл, у другу – 0,2, у третю – 0,4, у четверту – 0,6 у п'яту – 0,8 мл робочого розчину фруктози. Об'єм рідини в усіх пробірках доводять до 1 мл і додають до нього 1 мл розчину резорцину та 3 мл 30 % розчину соляної кислоти. У шосту пробірку замість розчину фруктози наливають 1 мл дистильованої води. Далі роботу проводять так само, як і під час дослідного визначення.

Обладнання

1) пробірки; 2) ступка з товкачиком; 3) водяна баня; 4) електрична плита; 5) піпетки об'ємом 0,1, 1 та 5 мл; 6) фотоелектроколориметр або спектрофотометр.

Реактиви

1) резорцин ($C_6H_6O_2$) 0,1 % розчин у етанолі; 2) соляна кислота (HCl) 30 % розчин; 3) стандартний розчин фруктози.

Приготування реактивів

Реактив № 1 (розчин резорцину у етанолі). 1 г резорцину розчиняють в 1 л 95 % етанолу.

Реактив № 2 (30 % розчин соляної кислоти). До 5 об'ємних частин концентрованої соляної кислоти (густина 1,19) додають 1 об'ємну частину дистильованої води. Розчин не повинен утворювати забарвлених продуктів за умови додавання резорцину.

Реактив № 3 (стандартний розчин фруктози). Готують насичений розчин бензойної кислоти. 100 мг фруктози марки х. ч. або ч. д. а. розчиняють у розчині бензойної кислоти. Цей розчин може зберігатися в холодильнику. У день аналізу

готують робочий розчин, змішуючи 4 мл розчину резорцину та 100 мл дистильованої води.

ПИТАННЯ ДЛЯ ПЕРЕВІРКИ ЗНАЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Наведіть характеристику фруктози (будова молекули, хімічні властивості, значення для рослин).
2. Дайте характеристику принципу метода визначення фруктози за методом Мак-Рері та Слаттері.
3. Як обчислюються концентрації фруктози для побудови калібрувального графіка?
4. Як проводиться очистка рослинного матеріалу від речовин, які заважають визначенню?

РОБОТА 6.7. ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ФРУКТОЗАНІВ ЗА МЕТОДОМ Х. Н. ПОЧИНКА

Принцип методу. Фруктозани – це група запасних полісахаридів, до складу яких, крім глюкози, входить фруктоза. Вони широко розповсюджені в рослинах і мають значення запасного енергетичного фонду. Фруктозани погано розчиняються в холодній воді, добре розчинні у гарячій воді і не розчиняються у спирті. Вони не мають редукуючої здатності, але легко гідролізуються кислотами, утворюючи редукуючі цукри. Дослідний рослинний матеріал обробляється 80 % етанолом для видалення низькомолекулярних цукрів, які заважають визначенню фруктозанів. Із промитого спиртом залишку фруктозани вилучають гарячою водою і після освітлення розчину визначають їх кількість колориметричним методом за допомогою молібдат-сірчанокислого реактиву.

Перебіг аналізу. Зважують 0,5–1 г подрібненого свіжого рослинного матеріалу, який містить від 1 до 10 мг фруктозанів, і розтирають у ступці з 3 мл 95 % етанолу до однорідної маси. Для вилучення фруктозанів із сухого рослинного матеріалу беруть 3 мл 80 % етанолу. Вміст ступки переносять у центрифугальну пробірку за допомогою 10 мл 80 % етанолу, настоюють 3 хв, періодично мішаючи рідину скляною паличкою. Далі витяжку центрифугують за 2 000 об./хв, надосадову рідину зливають, а осад промивають ще тричі порціями по 5 мл 80 % етанолу з настоюванням перед центрифугуванням 2–3 хв. Спиртові екстракти можна використати для визначення кількості низькомолекулярних цукрів або після перегонки використовувати етанол у подальшій роботі. Осад, який містить фруктозани, з допомогою 40 мл дистильованої води переносять у мірчу колбу об'ємом 50 мл. Колбу ставлять у киплячу воду та нагрівають протягом 30 хв. Далі колбу охолоджують, додають 1 мл 1 N розчину гідроксиду натрію, 1 краплину розчину фенолфталеїну та додають краплями 10 % розчин сульфату цинку

до зникнення забарвлення індикатору. Об'єм розчину доводять дистильованою водою до 50 мл, ретельно перемішують, дають відстоятися, відбирають із верхньої прозорої частини піпеткою 3 мл, які повинні містити від 30 до 200 мкг фруктозанів, та виливають у суху пробірку. Якщо у 3 мл розчину міститься більше ніж 200 мкг, то беруть відповідно меншу кількість розчину, розводячи його водою до 3 мл. До розчину у пробірці додають 2 мл молібдат-сірчаноокислого реактиву, закривають пробірку кульковою пробкою або маленькою лійкою та ставлять у киплячу воду на 20 хв. Після цього пробірку охолоджують, доводять об'єм рідини до 5 мл та вимірюють оптичну густину розчину за довжини хвилі 660 нм (червоний світлофільтр) у кюветі з оптичним шляхом 10 мм. Розчином для порівняння слугує дистильована вода. Вміст фруктозанів обчислюють за формулою:

$$x = \frac{50 \times 5 \times C}{10\,000 \times 3 \times n} = \frac{0,0833 \times C}{n},$$

де:

x – вміст фруктозанів, % (у перерахунку на рафінозу);

50 – об'єм дослідного розчину фруктозанів, мл;

3 – об'єм дослідного розчину, який взято для реакції з молібдат-сірчаноокислим реактивом, мл;

5 – об'єм розчину, у якому вимірюється оптична густина, мл;

C – концентрація фруктозанів у розчині, знайдена на калібрувальному графіку, мг/мл;

n – наважка рослинного матеріалу, г;

10 000 – коефіцієнт для перерахунку мікрограмів у грами та відсотки.

Побудова калібрувального графіка

У сухі пробірки наливають такі кількості розчину, який містить 100 мкг рафінози в 1 мл: 0,3; 0,6; 0,9; 1,2; 1,5 та 2,1 мл. Об'єм розчинів доводять до 3 мл дистильованою водою, у кожен пробірку додають по 2 мл 8 % розчину молібдату амонію у 4 N сірчаній кислоті (молібдат-сірчаноокислого реактиву), ретельно перемішують, пробірки накривають кульковими пробками (або лійками), занурюють у киплячу воду і нагрівають 20 хв. Далі розчини охолоджують і вимірюють оптичну густину за довжини хвилі 660–700 нм (червоний світлофільтр) у кюветі з оптичним шляхом 10 мм. За отриманими результатами будують калібрувальний графік. На осі абсцис відкладають значення концентрацій рафінози у мкг/мл, а на осі ординат – значення оптичної густини.

Обладнання

1) центрифугальні та звичайні пробірки; 2) ступка з товкачиком; 3) скляні палички; 4) мірчі колби об'ємом 50 мл; 5) піпетки об'ємом 1, 2 та 5 мл; 6) кулькові пробки або маленькі лійки; 7) водяна баня; 8) електрична плита; 9) центрифуга; 10) фотоелектроколометр або спектрофотометр.

Реактиви

1) етанол (C_2H_5OH) 95 % та 80 %; 2) гідроксид натрію (KOH) 1 N розчин; 3) фенолфталеїн 0,1 % розчин у 60 % спирті; 4) сульфат цинку ($ZnSO_4$) 10 % розчин; 5) молібдат-сірчаноокислий реактив; 6) стандартний розчин рафінози (100 мкг/мл).

Приготування реактивів

Реактив № 5 (молібдат-сірчаноокислий реактив). 8 г молібдату амонію розчиняють у 80 мл дистильованої води, додають 9 мл концентрованої сірчаної кислоти (густина 1,84), охолоджують та доводять об'єм розчину до 100 мл. Зберігають у пляшці з темного скла.

ПИТАННЯ ДЛЯ ПЕРЕВІРКИ ЗНАЙ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Дайте характеристику фруктозанів (хімічна будова, значення для рослин).
2. Які речовини заважають визначенню фруктозанів?
3. Як позбавляються від речовин, які заважають визначенню? Для чого використовується сульфат цинку?
4. Дайте характеристику фотометричного методу визначення речовин.
5. Яка реакція використовується для утворення забарвлених розчинів фруктозанів?
6. Як будується калібрувальний графік для визначення фруктозанів?

РОБОТА 6.8. ВИЗНАЧЕННЯ ГЛЮКОЗИ, ФРУКТОЗИ ТА САХАРОЗИ В РОСЛИНАХ У ОДНІЙ НАВАЖЦІ (ЗА МЕТОДОМ Х. Н. ПОЧИНКА)

Принцип методу. Редукуючі цукри в лужному середовищі за нагрівання відновлюють двовалентну мідь до одновалентної, яка випадає в осад у вигляді Cu_2O . Закис міді, що утворився, визначають йодометричним методом. Для цього мідно-лужний реактив на цукри містить KIO_3 та KI , які в лужному середовищі не реагують між собою та не заважають реакції міді з цукрами. За умов підкислення розчину виділяється йод, який взаємодіє з закисом міді у присутності щавлевої кислоти. Надлишок йоду титрують 0,01 N розчином тіосульфату натрію у присутності крохмалю. У частині дослідного розчину після проведення гідролізу сахарози щавлевою кислотою визначають суму цукрів та за різницею між сумою та вмістом редукуючих цукрів – сахарозу. У іншій частині розчину визначають фруктозу після окислення глюкози йодом у лужному середовищі.

Перебіг аналізу. Величина наважки дослідного матеріалу залежить від вмісту в ньому моносахаридів та суми цукрів. Кількість моносахаридів не повинна перевищувати 50 мг, суми цукрів – 100 мг (листя – 3–5, корені цукрового буряка – 0,5 г).

Попередньо у дослідному об'єкті інактивують ферменти. Для цього наважку переносять у скляний або алюмінієвий закритий бюкс і витримують 5–10 хв у водяній парі з температурою 100 °С. Далі пробу розтирають у ступці з невеликою кількістю води та переносять у мірчу колбу на 100 мл. Для осадження білків у витяжку додають 1 мл 1 N розчину NaOH та 1,2 мл 10 % розчину ZnSO₄ на кожний грам сирової наважки. Об'єм розчину у колбі доводять до 100 мл, перемішують та фільтрують у суху колбу. У фільтраті визначають відновлюючі цукри (глюкозу, фруктозу, мальтозу) та суму цукрів.

Визначення редукуючих цукрів

У конічні колби наливають 10 мл мідно-лужного реактиву та 10 мл фільтрату (якщо цукрів багато, можна взяти 5 мл фільтрату), вміст колб перемішують, колби ставлять у киплячу водяну баню та нагрівають протягом 15 хв, охолоджують холодною водою і визначають кількість редукуючих цукрів йодометричним титруванням. Для цього в колби обережно додають 5 мл щавлево-сірчанокислого реактиву. Відбувається нейтралізація розчину, виділяється йод, який реагує з закисом міді у присутності щавлевої кислоти. Після повного розчинення закису міді залишок йоду титрують 0,01 N розчином тіосульфату натрію, додаючи індикатор – 0,5 мл 0,5 % розчину крохмалю.

Для контрольного титрування беруть 10 мл мідно-лужного реактиву, 5 мл щавлево-сірчанокислого реактиву та 10 мл фільтрату. Гріти суміш не треба. Титрують 0,01 N розчином тіосульфату натрію до зникнення синього забарвлення.

Обчислення вмісту редукуючих цукрів проводять за формулою:

$$x = \frac{V \times [248 - (a - b)] \times (a - b)}{V_1 \times n \times 10\,000},$$

де:

x – кількість редукуючих цукрів, %;

V – загальний об'єм розчину, отриманий із наважки рослинного матеріалу, мл;

V_1 – кількість дослідного розчину, взятого для аналізу, мл;

a – кількість розчину тіосульфату, яка витрачена на титрування контрольного зразка, мл;

b – кількість розчину тіосульфату, яка витрачена на титрування дослідного зразка, мл;

n – наважка рослинного матеріалу, г;

$[248 - (a - b)]$ – кількість інвертного цукру, яка відповідає 1 мл 0,01 N розчину тіосульфату натрію, мкг;

$10\,000$ – коефіцієнт для перерахунку мікрограмів цукру у грами і результатів обчислення у відсотки.

Визначення суми цукрів

У мірчу колбу об'ємом 50 мл вносять піпеткою або циліндром 25 мл фільтрату, додають 2 мл 8 % розчину щавлевої кислоти та занурюють колбу у киплячу

воду на 10 хв. Далі колбу охолоджують, додають 1 краплю фенолфталеїну і нейтралізують 0,4 N розчином гідроксиду натрію до блідо-рожевого забарвлення рідини.

Об'єм нейтралізованого розчину доводять дистильованою водою до 50 мл та перемішують. Беруть 10 мл фільтрату у суху колбу, додають 10 мл мідно-лужного реактиву. Далі роботу проводять за схемою визначення редуруючих цукрів. Вміст суми цукрів обчислюють за формулою:

$$x = \frac{2 \times V \times [248 - (a - b)] \times (a - b)}{V_1 \times n \times 10\,000},$$

де:

x – вміст суми цукрів у перерахунку на глюкозу, %;

V – загальний об'єм дослідної витяжки, мл;

V_1 – об'єм витяжки, взятий для визначення суми цукрів, мл;

2 – фактор розведення розчину після гідролізу;

a – кількість розчину тіосульфату, яка витрачена на титрування контрольного зразка, мл;

b – кількість розчину тіосульфату, яка витрачена на титрування дослідного зразка, мл;

n – наважка рослинного матеріалу, г;

$[248 - (a - b)]$ – кількість інвертного цукру, яка відповідає 1 мл 0,01 N розчину тіосульфату натрію, мкг;

10 000 – коефіцієнт для перерахунку мікрограмів цукру у грами і результатів обчислення у відсотки.

Кількість сахарози обчислюють за такою формулою:

$$x = 0,95 \times (C - B),$$

де:

x – вміст сахарози в дослідному зразку, %;

C – вміст суми цукрів у перерахунку на глюкозу, %;

B – вміст редуруючих цукрів у перерахунку на глюкозу, %.

Визначення фруктози

У мірчу колбу об'ємом 50 мл вносять 25 мл фільтрату, додають 1–3 краплі 0,1 % розчину фенолфталеїну та нейтралізують 0,4 N розчином лугу до появи блідо-рожевого забарвлення. Додають 5 мл 0,05 N розчину йоду та 1 мл 0,4 N розчину гідроксиду натрію, перемішують та залишають на 10 хв. Далі в колбу додають 1 мл 0,4 N розчину соляної кислоти. Йод, який виділяється під час цього, знебарвлюють 0,05 N розчином сульфіту натрію до солом'яно-жовтого кольору, додають 2–3 краплі крохмалю і титрують сульфітом натрію до повного знебарвлення розчину. Відразу після цього в колбу додають 1 краплю фенолфталеїну та нейтралізують 0,4 N розчином лугу. Об'єм рідини в колбі доводять до 50 мл.

З отриманого розчину беруть 20 мл, переносять у суху колбу, додають 10 мл мідно-лужного реактиву, перемішують та ставлять у киплячу водяну баню на 15 хв. Подальшу роботу виконують за схемою визначення редуруючих цукрів.

Обчислення вмісту фруктози проводять за формулою:

$$x = \frac{2 \times V \times [99 \times (a - c) - (a - b)] \times \left[259 - (a - c) + \frac{220}{a - c} \right]}{V_1 \times n \times 10\,000},$$

де:

x – вміст суми цукрів у перерахунку на глюкозу, %;

V – загальний об'єм дослідної витяжки, мл;

V_1 – об'єм витяжки, взятий для визначення суми цукрів, мл;

2 – фактор розведення розчину після окислення глюкози йодом;

a – кількість розчину тіосульфату, яка витрачена на титрування контрольного зразка, мл;

b – кількість розчину тіосульфату, яка витрачена на титрування дослідного зразка для визначення редукуючих цукрів, мл;

c – кількість розчину тіосульфату, яка витрачена на титрування дослідного зразка для визначення фруктози, мл;

n – наважка рослинного матеріалу, г;

$10\,000$ – коефіцієнт для перерахунку мікрограмів цукру у грами і результатів обчислення у відсотки.

Кількість глюкози можна визначити за формулою:

$$x_{\text{глюкози}} = x_{\text{ред. цукрів}} - x_{\text{фруктози}},$$

де:

$x_{\text{глюкози}}$ – кількість глюкози, %;

$x_{\text{ред. цукрів}}$ – кількість редукуючих цукрів, %;

$x_{\text{фруктози}}$ – кількість фруктози, %.

Обладнання

1) мірні колби об'ємом 50 та 100 мл; 2) конічні колби об'ємом 100 мл; 3) піпетки об'ємом 5 та 10 мл; 4) мірні циліндри об'ємом 25 та 50 мл; 5) бюретка для титрування об'ємом 25 мл; 6) водяні бані; 7) електрична плита; 8) ступка з товкачиком.

Реактиви

1) мідно-лужний реактив; 2) суміш щавлевої та сірчаної кислот; 3) гідроксид натрію (NaOH) 0,4 N та 1 N розчини; 4) соляна кислота (HCl) 0,4 N розчин; 5) йод (I_2) 0,05 N розчин; 6) сульфат натрію (Na_2SO_3) 0,05 N розчин; 7) сульфат цинку ($ZnSO_4$) 10 % розчин; 8) тіосульфат натрію ($Na_2S_2O_3$) 0,01 N розчин (готується з фіксаналу); 9) фенолфталеїн 0,1 % розчин у 60 % етанолі; 10) крохмаль 0,5 % розчин.

Приготування реактивів

Реактив № 1 (мідно-лужний реактив). 75 г безводного карбонату натрію (Na_2CO_3) розчиняють у 400 мл води у літровій колбі. У іншій колбі у 400 мл води розчиняють 12 г сульфату міді ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) та 21,5 г винної кислоти. У цей розчин за умови постійного перемішування додають розчин карбонату натрію. Додавання проводять обережно, не допускаючи виділення діоксиду вуглецю (CO_2). У розчин додають 0,890 г йодату калію (KIO_3) та 8 г йодиду калію (KI), перемішують до повного розчинення солей. Об'єм реактиву доводять водою у мірчій колбі до 1 л, переливають його в колбу на 2 л та кип'ятять у водяній бані протягом 5 хв. Готовий реактив залишають на ніч для охолодження та відстоювання.

Реактив № 2 (суміш щавлевої та сірчаної кислот). Зважують 60 г щавлевої кислоти та розчиняють її у 800 мл води. У розчин додають 70 мл концентрованої сірчаної кислоти. Об'єм рідини доводять до 1 л.

ПИТАННЯ ДЛЯ ПЕРЕВІРКИ ЗНАТЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. У чому полягає принцип методу роздільного визначення трьох цукрів у їх суміші?
2. Яка залежність існує між кількістю розчину тіосульфату натрію, яка витрачена на титрування, та вмістом цукру у розчині?
3. Які компоненти входять до складу мідно-лужного реактиву та яке їх призначення?
4. Для чого використовується щавлево-сірчаноокислий реактив?
5. Чи можна стверджувати, що під час цієї роботи визначається вміст тільки глюкози, фруктози та сахарози?

РОБОТА 6.9. ЯКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ЦУКРІВ МЕТОДОМ ХРОМАТОГРАФІЇ НА ПАПЕРІ

Принцип методу. Хроматографічний метод оснований на неоднаковій розчинності речовин у сумішах полярних та неполярних розчинників. Ця властивість обумовлює неоднакову швидкість руху речовин носієм (тверда фаза для розподільчої хроматографії). Різна швидкість руху приводить до певних відмінностей у відстані, яку проходять речовини носієм (відносна рухомість). Відносна рухомість є постійною величиною для певної речовини, яка може бути виміряна і використана для ідентифікації речовин.

Перебіг аналізу. За допомогою цього методу можна порівняно швидко розділити складну суміш цукрів на індивідуальні цукри та ідентифікувати їх. Хроматографічний метод використовується і для якісного, і для кількісного визначення цукрів.

Приготування екстракту цукрів

Беруть наважку рослинного матеріалу в кількості 1–5 г та фіксують гарячим етанолом. Далі спиртовий розчин фільтрують через паперовий фільтр, а рослинну тканину розтирають і 2–3 рази екстрагують цукри 80 % етанолом за температури 80 °С, згущують у вакуумі за температури не вище 35–40 °С або у потоці повітря за кімнатної температури. Згущений екстракт обробляють у ділильній лійці петролейним або діетиловим ефіром для видалення пігментів. Отриманий екстракт без подальшого очищення може бути використаний для нанесення на хроматограму.

Нанесення екстракту на хроматограму

Для хроматографічного розділення цукрів використовується хроматографічний папір марки «швидкий» або «середній» у вигляді смуг довжиною 50 см та шириною 18–20 см. На відстані 3 см від верхнього краю проводять простим олівцем лінію старту, на якій, відступивши 3 см від лівого боку паперу, через кожні 3 см ставлять крапки. Ці крапки є місцями нанесення розчинів. За допомогою мікропіпетки дослідний розчин наносять на лінію старту у вигляді плями діаметром не більше ніж 5 мм. У кожній плямі повинно міститися від 20 до 100 мкг цукрів (0,01–0,03 мл витяжки). Поряд із дослідною плямою наносять розчини свідків (відомих цукрів) по 0,004 мл 2 % розчинів.

Розділення та ідентифікація цукрів

Розділення цукрів ґрунтується на різному їх розподілі між двома рідинами, які не змішуються, однією з яких є вода, а іншою – органічний розчинник (н-бутанол, піридин або фенол). Різне розподілення речовин у двох рідинах, які не змішуються, обумовлено неоднаковою розчинністю і виражається коефіцієнтом розподілу ***K***. Принцип методу полягає в тому, що через смугу хроматографічного паперу, на яку нанесено водний розчин суміші цукрів, пропускають органічний розчинник. За цих умов цукри розподіляються між водою та органічним розчинником відповідно до величини їх коефіцієнтів розподілу. Коефіцієнти розподілу у різних цукрів неоднакові, тому відбувається розділення їх суміші. Ступінь рухомості речовини на хроматограмі виражають через відношення шляху, пройденого цією речовиною від лінії старту, до відстані, яку пройшов фронт розчинника. Цей показник позначається ***R_f***.

Широко використовується як розчинник суміш н-бутанол–оцтова кислота–вода у співвідношенні 4 : 1 : 5. Добре розділення цукрів досягається застосуванням розчинника, який складається з етилацетату–оцтової кислоти–води у співвідношенні 9 : 2 : 2. Якщо розчинник поділяється на два шари, тоді нижній шар зливається на дно хроматографічної камери, а верхній – у ванночку, у яку занурюють верхній край хроматограми.

Розчинник через хроматограму пропускають тричі. Після кожного проходження розчинника хроматограми виймають із хроматографічних камер та висушують у витяжній шафі. Розчинник кожного разу замінюють новим.

Проявлення хроматограми

Ідентифікацію цукрів ведуть з допомогою проявників, якими обприскують хроматограми. Найбільш часто застосовуються проявники, вказані нижче.

Резорцин-фосфат. 0,2 г перекристалізованого резорцину розчиняють у 100 мл 96 % етанолу і зберігають у темній пляшці не більше двох місяців. Перед обприскуванням змішують 10 об'ємів цього розчину з одним об'ємом о-фосфornoї кислоти (густиною не менше 1,6 г/мл). Хроматограма після обприскування та просушування на повітрі витримується за температури 85 °С протягом 3–5 хвилин. Фруктоза, сахароза та інші олігоцукри дають рожеве забарвлення на блідо-рожевому фоні.

Розчин сечовини. 5 г сечовини розчиняють у 80 мл 96 % етанолу та додають 20 мл 2 N HCl. Хроматограму після обприскування та просушування проявляють протягом 5–10 хв за температури 100 °С. Плями кетоз мають синє забарвлення.

Анілін-фталат. 1,66 г фталевої кислоти розчиняють у 95 мл н-бутанолу, додають 0,93 г перекристалізованого аніліну та доводять об'єм н-бутанолом до 100 мл.

Орцин-трихлороцтова кислота (проявник на гептулози та пентулози). 0,5 г орцину та 15 г трихлороцтової кислоти розчиняють у 100 мл насиченого водою н-бутанолу. Плями гептулоз та пентулоз мають специфічне синьо-зелене забарвлення, плями кетогексоз мають жовтий колір, альдогексози (якщо їх кількість у плямі перевищує 100 мкг) проявляються у вигляді зеленкувато-коричневих плям. Проявляють хроматограми за температури 105 °С протягом 15–20 хв.

Орто-толуїдин–саліцилова кислота. 4 г саліцилової кислоти та 5 мл орто-толуїдину розчиняють у 100 мл 96 % етанолу. Із альдопентозами реактив утворює вишнево-червоне забарвлення, з альдогексозами – брудно-зелене. Із 1 % фруктозою утворюється дуже слабке коричневе забарвлення, а з сахарозою та рафінозою проявник не реагує.

РОБОТА 6.10. ЯКІСНЕ РОЗДІЛЕННЯ ЦУКРІВ НА РАДІАЛЬНІЙ ХРОМАТОГРАМІ

Перебіг аналізу. Витяжку цукрів та проявлення хроматограм ведуть так само, як і в попередній роботі. Для розділення цукрів використовується суміш бутанол–оцтова кислота–вода у співвідношенні 4 : 5 : 1. Процес розділення цукрів проводять у великому ексікаторі. Для цього із хроматографічного паперу вирізають круг із діаметром, який дорівнює діаметру кришки ексікатора. У середині

хроматографічного паперу роблять круглий отвір діаметром 2 см і на відстані 2 см від краю отвору простим олівцем проводять коло. Круг паперу поділяють на 6 або 8 секторів, і в середині кожного сектору на колі ставлять крапки (місця, на які будуть наноситися дослідні розчини цукрів та розчини свідків). Усі помітки та написи на хроматографічному папері робляться тільки простим олівцем. У кожену точку на хроматограмі наносять 30–40 мкл дослідної витяжки або розчину свідку. Як свідки використовують 0,2 % розчини цукрів (глюкоза, фруктоза, сахароза та інші).

Розділення проводиться за схемою, описаною нижче. У ексикатор ставить ся хімічна склянка об'ємом 100 мл, у яку наливається верхній шар суміші для розділення цукрів. Нижній шар зливається на дно ексикатора. Для подачі розчину до хроматограми з хроматографічного паперу робиться циліндр, верхній край якого розрізається в декількох місцях на глибину приблизно 1,5 см.

Довжина циліндра повинна на 1,5 см перевищувати відстань від дна склянки до поверхні хроматограми. Нижній край циліндра занурюють у розчин у склянці, а верхній встромляють в отвір у аркуші хроматографічного паперу і краї згинають так, щоб забезпечувався надійний контакт хроматограми з циліндром. Розділення ведуть доти, поки суміш пройде приблизно $\frac{3}{4}$ відстані від центру до краю хроматограми. Для кращого розділення цукрів після просушування хроматограми можна повторити пропускання розчинника через папір.

Обладнання (до робіт 6.9 та 6.10)

1) хроматографічний папір марки «Ш» або «С»; 2) хроматографічні камери; 3) мікропіпетки; 4) конічні колби об'ємом 100 мл; 5) водяна баня; 6) ділільні лійки; 7) виварювальні чашки; 8) вакуум-ексикатор; 9) насос Камовського або електричний вакуумний насос; 10) ексикатор для проведення хроматографії (великий).

Реактиви (до робіт 6.9 та 6.10)

1) н-бутанол ($C_4H_{10}O$); 2) оцтова кислота (CH_3COOH); 3) резорцин ($C_6H_6O_2$); 4) о-фосфорна кислота (H_3PO_4); 5) сечовина (CH_4N_2O); 6) орцин ($C_7H_8O_2$); 7) трихлороцтова кислота (CCl_3COOH); 8) анілін ($C_6H_5NH_2$); 9) набір цукрів.

ПИТАННЯ ДЛЯ ПЕРЕВІРКИ ЗНАНЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Наведіть етапи виконання роботи.
2. Охарактеризуйте принцип методу хроматографічного розділення речовин на папері.
3. У який спосіб здійснюється екстракція та очищення цукрів від домішок?
4. Охарактеризуйте хроматографічну камеру.
5. Чому розчинник пропускають через хроматограму декілька разів?
6. У який спосіб ідентифікуються проявлені на хроматограмі плями цукрів?

7. Як проявляється хроматограма? Наведіть склад основних проявників для кето- та альдоцукрів.

РОБОТА 6.11. ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ КРОХМАЛЮ ОБ'ЄМНИМ МЕТОДОМ (ЗА МЕТОДОМ Х. Н. ПОЧИНКА)

Принцип методу. Метод оснований на розчиненні крохмалю за умови нагрівання у 80 % розчині нітрату кальцію та осадженні його з отриманого розчину йодом. Крохмаль окислюється біхроматом калію у присутності сірчаної кислоти до діоксиду вуглецю та води. Надлишок біхромату калію реагує з йодистим калієм із виділенням йоду, який титрують розчином тіосульфату у присутності крохмалю.

Перебіг аналізу. Маса наважки залежить від вмісту у ній крохмалю (від 20 до 200 мг). Наприклад, 3 г листя, 1 г бульб картоплі та 0,25 г зерна. Наважку розтирають у ступці з 5 мл 80 % розчину нітрату кальцію, далі отриману масу переносять у конічну колбу об'ємом 100 мл, ступку змивають 10 мл розчину нітрату кальцію та зливають його у колбу. Колбу накривають лійкою та кип'ятять рідину 3–5 хв залежно від вмісту крохмалю: якщо мало – 3 хв, за більшого вмісту – 5 хв (кипіння повинно бути слабким). За цих умов крохмаль переходить у колоїдний розчин. Після кип'ятіння у колбу наливають 20 мл води, змиваючи цією самою водою лійку, перемішують, вміст колби переносять у центрифугальну пробірку, центрифугують 2–3 хв за 2 000–3 000 об./хв. Розчин зливають у мірчу колбу об'ємом 100 мл (якщо мало крохмалю, беруть колбу об'ємом 50 мл).

Колбу, у якій кип'ятилася витяжка, і осад рослинного матеріалу промивають 2–3 рази гарячою водою у кількості 5–10 мл кожного разу, центрифугують та об'єднують центрифугат з основним розчином. Далі об'єм вмісту колби доводять дистильованою водою до 100 або 50 мл і в отриманому розчині визначають кількість крохмалю.

У центрифугальну пробірку наливають 2 мл 0,5 % розчину йоду та 5 мл (або 10 для аналізу листя) розчину крохмалю з дослідного зразка, перемішують та залишають на 15 хв. За цей час відбувається утворення йодно-крохмального комплексу темно-синього кольору. Через 15 хв рідину центрифугують, надосадовий розчин зливають, а осад промивають, додаючи 5 мл розчину, який містить 5 % нітрату кальцію та 0,01 % йоду, і перемішуючи осад скляною паличкою, знову центрифугують. Промивання повторюють 3–5 разів. Якщо в наважці міститься велика кількість домішок, наприклад, у листі, то промивання повторюють не менше п'яти разів. До промитого осаду додають 5 мл 0,5 N розчину біхромату калію у сірчаній кислоті та ставлять пробірку у киплячу водяну баню на 10 хв, охолоджують. Вміст пробірки переносять у колбу для титрування, змиваючи 10 мл дистильованої води, додають 60 мл води для розведення сірчаної кислоти,

охладжують, додають 5 мл 20 % розчину йодистого калію. Йод, який утворився під час взаємодії йодистого калію та надлишку біхромату калію, титрують 0,1 N розчином тіосульфату натрію, додаючи наприкінці процесу, як індикатор, 1 мл 0,5 % розчину крохмалю.

Паралельно титрують 5 мл 0,5 N розчину біхромату, попередньо розводять його такою самою кількістю води, як і у дослідному титруванні (70 мл).

Вміст крохмалю обчислюють за формулою:

$$x = \frac{0,675 \times V \times K \times (a - b)}{V_1 \times n},$$

де:

x – вміст крохмалю, %;

V – загальний об'єм витяжки, мл;

V_1 – об'єм розчину, взятий для осадження крохмалю, мл;

a – кількість розчину тіосульфату натрію, яка витрачена на титрування біхромату калію (контроль), мл;

b – кількість розчину тіосульфату натрію, яка витрачена на титрування дослідної проби, мл;

K – нормальність розчину тіосульфату;

n – наважка рослинного матеріалу, г;

0,675 – нормальний титр крохмалю, помножений на 100 для перерахунку у відсотки.

ПИТАННЯ ДЛЯ ПЕРЕВІРКИ ЗНАНЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Дайте характеристику молекули крохмалю: а) будова молекули; б) хімічні властивості; в) фізіологічна роль у життєдіяльності рослин.
2. В чому полягає принцип об'ємного методу визначення кількості крохмалю?
3. Яка залежність існує між кількістю розчину тіосульфату натрію, витраченого на титрування, та вмістом крохмалю?
4. Чому для промивання йодно-крохмального комплексу використовується розчин нітрату кальцію, який містить йод?

РОБОТА 6.12. КОЛОРИМЕТРИЧНИЙ МЕТОД ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ КРОХМАЛЮ (ЗА МЕТОДОМ Х. Н. ПОЧИНКА)

Принцип методу. Після розчинення крохмалю у 80 % розчині нітрату кальцію та осадження його йодом осад розчиняють у гідроксиді натрію. Далі проводять реакцію з йодом у кислому середовищі. Оптичну густину отриманого синього розчину вимірюють за довжини хвилі 610–660 нм та знаходять концентрацію крохмалю за допомогою калібрувального графіка.

Перебіг аналізу. Наважку добирають так, щоб у ній містилося від 5 до 50 мг крохмалю (приблизно вибрати наважку можна за результатами попередньої роботи). Дослідний матеріал розтирають у ступці з 5 мл 80 % розчину нітрату кальцію і переносять у конічну колбу на 100 мл. Залишок у ступці змивають 10 мл 80 % розчину нітрату кальцію. Крохмаль екстрагують у розчин так само, як і у попередньому методі. Після екстрагування об'єм витяжки доводять до 50 або 100 мл. Із витяжки беруть 5 або 10 мл у центрифугальну пробірку, в яку попередньо наливають 2 мл 0,5 % розчину йоду, перемішують та залишають на 5 хв. Центрифугують, надосадову рідину зливають, а осад 2 рази промивають 5 % розчином нітрату кальцію, який містить 0,01 % йоду. До промитого осаду додають 10 мл 0,1 N розчину гідроксиду натрію, перемішують та занурюють у киплячу воду на 5 хв. Розчин переносять у мірчу колбу на 50 мл, додають 0,3 мл 0,5 % розчину йоду, розводять водою приблизно до 40 мл, додають 2 мл 1 N розчину соляної кислоти. Об'єм розчину доводять до 50 мл, перемішують та колориметрують за жовтим світлофільтром.

Концентрацію крохмалю в розчині визначають за калібрувальним графіком. Кількість крохмалю обчислюють за формулою:

$$x = \frac{50 \times V \times C}{10\,000 \times V_1 \times n'}$$

де:

x – вміст крохмалю у рослинному матеріалі;

V – загальний об'єм витяжки, мл;

V_1 – об'єм розчину, який взято для осадження крохмалю, мл;

50 – об'єм забарвленого розчину, який колориметрується, мл;

C – концентрація крохмалю у розчині, знайдена за калібрувальним графіком, мкг/мл;

n – наважка рослинного матеріалу, г;

$10\,000$ – коефіцієнт для переведення мікрограмів у грами та відсотки.

Побудова калібрувального графіка

Для побудови калібрувального графіка беруть 50 мг очищеного крохмалю, або наважку неочищеного крохмалю, попередньо встановивши його вміст об'ємним методом. Наважку розтирають у ступці з 3 мл 80 % розчину нітрату кальцію, масу переносять у конічну колбу на 100 мл, промивають ступку 15 мл розчину нітрату кальцію та кип'ятять протягом 5 хв. Розчин охолоджують, переносять у мірчу колбу об'ємом 50 мл та доводять об'єм розчину водою до 50 мл (1 мл цього розчину містить 1 мг крохмалю). У 6 центрифугальних пробірок набирають 0,5; 1; 2; 3; 4 та 5 мл стандартного розчину крохмалю, розводять до 5 мл 20 % розчином нітрату кальцію, додають по 2 мл 0,5 % розчину йоду, перемішують та залишають у такому стані на 15 хв. Далі рідину центрифугують, осад про-

мивають 2 рази 5 % розчином нітрату кальцію з подальшим центрифугуванням. Осад в усіх пробірках розчиняють у 10 мл 0,1 N гідроксиду натрію. Розчини переносять у мірчі колби об'ємом 50 мл, додають по 0,3 мл 0,5 % розчину йоду, 2 мл 1 N розчину соляної кислоти, об'єм доводять до 50 мл та визначають оптичну густину за жовтим світлофільтром на фотоелектроколориметрі або спектрофотометрі за довжини хвилі 630 нм. На основі отриманих даних будують калібрувальний графік, відкладаючи на осі абсцис вміст крохмалю (мг), а на осі ординат – оптичну густину.

Обладнання (для робіт 6.11 та 6.12)

1) ступки з товчачиками; 2) мірчі колби об'ємом 50 мл; 3) центрифугальні пробірки; 4) бюретки; 5) піпетки об'ємом 1, 5 та 10 мл; 6) фотоелектроколориметр або спектрофотометр; 7) водяна баня; 8) центрифуга; 9) електрична плита.

Реактиви (для робіт 6.11 та 6.12)

1) нітрат кальцію $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 80 %, 20 % та 5 % розчини; 2) йодид калію (KI) 20 % розчин; 3) крохмаль 0,5 % розчин; 4) тіосульфат натрію ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 0,1 N розчин (готується з фіксаналу); 5) біхромат калію ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) 0,5 N розчин у сірчаній кислоті; 6) стандартний розчин крохмалю для калібрувального графіка; 7) йод (I_2) 0,5 % розчин; 8) соляна кислота (HCl) 1 N розчин.

Приготування реактивів

Реактив № 1 (розчин нітрату кальцію (80 %)). Зважують на технічних терезах 200 г $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, розчиняють у 70 мл дистильованої води у мірчому циліндрі, доводять об'єм розчину до 250 мл та ретельно перемішують. Із цього розчину готують 20 % та 5 % розчини крохмалю з йодом для промивання осаду йодиду крохмалю. Для приготування промивного розчину беруть 10 мл 80 % розчину нітрату кальцію, переносять у мірчий циліндр, розводять дистильованою водою до 160 мл, додають 3 мл 0,5 % йоду та ретельно перемішують. Цей розчин готують безпосередньо перед промиванням осаду.

Реактив № 5 (розчин біхромату калію в сірчаній кислоті). Зважують 25 г $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ із точністю до 0,01 г, розчиняють у 250 мл води в колбі об'ємом не менше 2 л, і поступово за умови охолодження додають 800 мл концентрованої сірчанної кислоти (густина 1,84), ретельно перемішують і після охолодження переливають у пляшку з темного скла. Зберігають у темному місці.

Реактив № 6 (очищення крохмалю). 1 г крохмалю розтирають у ступці з 10 мл дистильованої води, додаючи її поступово. Отриману суспензію переносять у конічну колбу об'ємом 250 мл, додають 15 мл 1 N розчину гідроксиду натрію, накривають лійкою та нагрівають до розчинення крохмалю. Гарячий розчин фільтрують через вату у склянку об'ємом 250 мл. Розчин охолоджують, додають 100 мл 95 % етанолу, перемішують і дають утворитися осаду. Рідину над осадом

повністю зливають, а осад промивають декантацією 2 рази порціями по 50 мл 60 % етанолу. До осаду додають ще 25 мл 60 % етанолу, 1 мл 1 N розчину соляної кислоти, ретельно перемішують та фільтрують через фільтр Шотта № 3 або центрифугують, промивають осад 60 % етанолом до повного видалення іонів хлору (проба з нітратом срібла). Після цього крохмаль переносять у скляний бюкс та висушують за температури 100 °С. Промивну рідину, яка містить спирт, збирають та відганяють за температури 78 °С.

Реактив № 7 (розчин йоду (0,5 %)). зважують 5 г кристалічного йоду та 10 г йодиду калію (KI) з точністю до 0,01 г, розтирають у ступці спочатку суху суміш реактивів, а далі з 10 мл дистильованої води до розчинення всього йоду. Розчин переносять у мірчу колбу об'ємом 1 л, змиваючи ступку декілька разів дистильованою водою. Об'єм розчину доводять дистильованою водою до 1 л і рідину ретельно перемішують. Зберігають у добре закритій пляшці з темного скла.

Реактив № 8 (розчин соляної кислоти (1 N)). Беруть 400–500 мл дистильованої води і додають у неї 84 мл концентрованої соляної кислоти (густина 1,19). Отриманий розчин розводять дистильованою водою до 1 л та ретельно перемішують.

ПИТАННЯ ДЛЯ ПЕРЕВІРКИ ЗНАЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Дайте характеристику колориметричного методу визначення крохмалю в рослинах.
2. Як обчислюється наважка рослинного матеріалу для визначення крохмалю цим методом?
3. Як обчислюються значення концентрацій крохмалю, які відкладаються на осі абсцис під час побудови калібрувального графіка?

РОБОТА 6.13. ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ЦЕЛЮЛОЗИ ЗА МЕТОДОМ Х. Н. ПОЧИНКА

Целюлоза – полісахарид, який складає основну масу клітинних стінок рослин. Наприклад, деревина більш ніж на 50 % складається з целюлози, бавовна – більш ніж на 90 %. Мономером целюлози є целобіоза, молекули якої з'єднані глікозидними зв'язками у ниткоподібні, нерозгалужені молекулярні ланцюжки. У клітинних стінках целюлоза перебуває у зв'язку з геміцелюлозою, лігніном та деякими іншими речовинами. Целюлоза не розчиняється у воді, розведених кислотах та лугах, органічних розчинниках. Під час кип'ятіння з концентрованою сірчаною кислотою целюлоза повністю руйнується до глюкози.

Принцип методу. Дослідний матеріал обробляється сумішшю оцтової та азотної кислот під час нагрівання. За цих умов розчиняється міжклітинна речовина, і целюлоза розпадається на окремі волокна. Також відбувається видалення

лігніну, геміцелюлоз і гідроліз крохмалю, пентозанів та інших речовин. Після видалення домішок промиванням водою целюлоза окислюється біхроматом калію у присутності сірчаної кислоти. Надлишок біхромату визначають йодометричним титруванням.

Перебіг аналізу. Беруть наважку рослинного матеріалу (0,05 г листя, 0,4 г насіння), подрібнюють її у ступці та переносять у центрифугальні пробірки. У пробірки наливають суміш оцтової та азотної кислот (якщо наважка менше 0,1 г, беруть 5 мл суміші, за більшої наважки беруть 10 мл суміші оцтової та азотної кислот). Пробірки закривають маленькою скляною лійкою і занурюють у киплячу воду на 25 хв. Рідину у пробірках періодично струшують. Після нагрівання пробірки охолоджують та центрифугують. Надосадову рідину зливають, а у пробірки додають 10 мл дистильованої води, ретельно перемішують і знову центрифугують. Осад промивають дистильованою водою 3 рази. Далі до осаду додають 10 мл біхромату калію у сірчаній кислоті, мішають суміш скляною паличкою і пробірки занурюють у киплячу воду на 10 хв. Після цього пробірки охолоджують і рідину переносять у конічну колбу об'ємом 250 мл. Залишки рідини у пробірці змивають 2–3 рази дистильованою водою (загальний об'єм води для промивання складає 10–15 мл). До розчину, який містить надлишок біхромату калію, додають 60 мл дистильованої води для розведення сірчаної кислоти, охолоджують, додають 5 мл 20 % розчину йодиду калію і йод, який утворився під час реакції з біхроматом калію, титрують 0,1 N розчином тіосульфату натрію, додаючи 1 мл 0,5 % розчину крохмалю як індикатор.

Паралельно ведуть контрольне титрування. Для цього беруть 10 мл 0,5 N розчину біхромату калію, додають приблизно 70 мл дистильованої води, охолоджують, додають 5 мл 20 % розчину йодиду до калію і титрують. Як індикатор використовують 0,5 % розчин крохмалю.

Вміст целюлози знаходять за формулою:

$$x = \frac{0,675 \times K \times (a - b)}{n},$$

де:

x – вміст целюлози, %;

K – нормальність розчину тіосульфату;

a – об'єм 0,1 N розчину тіосульфату, який витрачено на титрування контрольного зразка, мл;

b – об'єм 0,1 N розчину тіосульфату, який витрачено на титрування дослідного зразка, мл;

n – наважка дослідного матеріалу, г;

6,0675 – нормальний титр целюлози, помножений на 100.

Обладнання

1) ступка з товкачиком; 2) центрифугальні пробірки; 3) скляні лійки; 4) конічні колби об'ємом 250 мл; 5) бюретка; 6) піпетки об'ємом 1, 5 та 10 мл; 7) центрифуга; 8) водяна баня; 9) електрична плита.

Реактиви

1) суміш оцтової та азотної кислот; 2) біхромат калію ($K_2Cr_2O_7$) 0,5 N розчин у сірчаній кислоті; 3) йодид калію (KI) 20 % розчин; 4) крохмаль 0,5 % розчин; 5) тіосульфату натрію ($Na_2S_2O_3$) 0,1 N розчин (готується з фіксаналу).

Приготування реактивів

Реактив № 1 (суміш оцтової та азотної кислот). До 100 мл 80 % оцтової кислоти додають 10 мл азотної кислоти (густина 1,4), ретельно перемішують. Зберігають у темній пляшці.

Реактив № 2 (розчин біхромату калію в сірчаній кислоті (0,5 N)). 25 г біхромату калію ($K_2Cr_2O_7$) розчиняють у 250 мл дистильованої води в колбі об'ємом не менше 2 л та поступово додають 300 мл концентрованої сірчаної кислоти (густина 1,84). Ретельно перемішують, охолоджують та переливають у пляшку з темного скла.

Реактив № 3 (розчин йодиду калію (20 %)). Зважують 20 г йодиду калію (KI) розчиняють у воді, додають 1 мл 2 N розчину гідроксиду натрію (NaOH), об'єм розчину доводять дистильованою водою до 100 мл. Зберігають у пляшці з темного скла.

Реактив № 4 (розчин крохмалю (0,5 %)). Зважують 0,5 г крохмалю, висипають у ступку, додають 5–10 мл гарячої дистильованої води і розтирають товкачиком до однорідної маси. Паралельно нагрівають до кипіння 90 мл дистильованої води. Суспензію крохмалю із ступки переносять у колбу з гарячою водою, змиваючи ступку декілька разів водою. Суміш ставлять на електричну пічку і кип'ятять 5 хв. Після охолодження об'єм розчину доводять до 100 мл. Зберігають не більше доби. Для більш тривалого зберігання (до 1 тижня) до розчину можна додати 10–15 мг тимолу.

ПИТАННЯ ДЛЯ ПЕРЕВІРКИ ЗНАНЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Яку будову має молекула целюлози?
2. Дайте характеристику хімічних та фізичних властивостей целюлози, її значення в життєдіяльності рослин.
3. Наведіть характеристику глікозидного зв'язку.
4. Дайте характеристику принципу методу визначення вмісту целюлози в рослинах за методом Х. Н. Починка.
5. Які речовини заважають визначенню вмісту целюлози за методом Х. Н. Починка та чому?

6. Для чого під час визначення целюлози застосовується суміш оцтової та азотної кислот?

7. Яка залежність існує між кількістю розчину тіосульфату натрію, що використовується для титрування, та вмістом целюлози в дослідному зразку?

РОБОТА 6.14. ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ПЕКТИНОВИХ РЕЧОВИН У РОСЛИНАХ

Принцип методу. До пектинових речовин належать пектинова кислота, пектин та протопектин. Пектинова кислота – це полімерна сполука, мономером якої є галактуронова кислота (пектинова кислота ще має назву полігалактуронова кислота). Пектин – метоксильована полігалактуронова кислота (складний ефір полігалактуронової кислоти та метанолу). Протопектин – сполука пектину з галактаном та арабаном клітинної стінки. Пектин та пектинова кислота добре розчиняються у воді, протопектин не розчиняється у воді.

Метод оснований на перетворенні різних пектинових речовин на пектинову кислоту. Далі пектинову кислоту осаджують у вигляді пектату кальцію (кальцієва сіль пектинової кислоти) і вимірюють її вміст гравіметричним методом.

Залежно від мети досліді можна визначити окремо розчинний пектин та протопектин або їх суму. Перебіг аналізу залишається однаковим в обох випадках. Різниця полягає в тому, що під час окремого визначення вимірювання кількості пектинової кислоти проводять у кожному з двох екстрактів окремо, а під час визначення суми пектинів – екстракти об'єднують.

Перебіг аналізу. 5 г свіжого рослинного матеріалу ретельно розтирають до гомогенної маси (для полегшення розтирання в суміш можна додати подрібнене скло) та екстрагують цукри, тричі промивають розтерту масу етанолом (1 раз 95 % та двічі – 80 %). Далі рослинний матеріал промивають ацетоном та сушать на повітрі. До залишку рослинної маси після видалення цукрів та пігментів додають у конічний колбі 100 мл дистильованої води та витримують у киплячій водяній бані 30 хв. Краще рослинну масу заливати водою у центрифугальних пробірках об'ємом 100 мл. Пробірки або колби закривають гумовими пробками та енергійно струшують під час нагрівання. Після нагрівання екстракт центрифугують, надосадову рідину фільтрують через паперовий фільтр у мірчу колбу об'ємом 250 мл. Залишки у центрифугальній пробірці ще двічі екстрагують водою (75 та 60 мл), об'єднуючи екстракти. Об'єм об'єднаного екстракту доводять до 250 мл, якщо розчин мутний, його ще раз центрифугують або фільтрують. Внаслідок цього буде отримана витяжка № 1.

Увесь залишок із центрифугальних пробірок за допомогою 50 мл 0,3 N розчину HCl переносять у конічну колбу. Колбу закривають пробкою зі зворотним холодильником та нагрівають протягом 30 хв у киплячій водяній бані. Після

цього рідину фільтрують через паперовий фільтр у мірчу колбу об'ємом 500 мл. Залишок на фільтрі ще декілька разів промивають гарячою водою. Фільтр із осадом обережно скляною паличкою переносять в екстракційну колбу, додають туди 50–70 мл розчину цитрату амонію і нагрівають у киплячій бані 30 хв. Екстракт фільтрують у мірчу колбу, об'єднуючи з попереднім екстрактом. Осад на фільтрі декілька разів промивають гарячою водою. Після охолодження об'єм екстракту в колбі доводять дистильованою водою до 500 мл (екстракт № 2, який містить пектинову кислоту та нерозчинний протопектин).

Подальший аналіз обох екстрактів практично однаковий. Беруть 50 або 100 мл екстракту № 1 (об'єм залежить від розведення та очікуваної кількості пектинових речовин), додають 50 або 100 мл 0,4 % розчину гідроксиду натрію та залишають на ніч за кімнатної температури. Наступного дня розчин підкислюють 1 N розчином оцтової кислоти (об'єм кислоти повинен дорівнювати об'єму лугу, який було використано для омилення ефірного зв'язку, тобто 50 або 100 мл) та осаджують пектинову кислоту, додаючи до екстракту 50 або 100 мл 11,1 % розчину хлориду кальцію. Отриманий осад пектату кальцію фільтрують через попередньо висушений до постійної маси паперовий фільтр, промивають на фільтрі 0,5 % розчином хлориду кальцію та багаторазово дистильованою водою для видалення хлориду кальцію (повноту видалення перевіряють реакцією на хлор із нітратом срібла). Наприкінці осад ще декілька разів промивають гарячою водою для видалення солей. Фільтр із осадом переносять пінцетом у металевий бюкс та висушують до постійної маси за температури 100–105 °С. Масу осаду, отриману як різницю між масою фільтра з осадом пектату кальцію та масою сухого фільтра, помножують на 0,9235 для перерахунку на пектинову кислоту. Маса сухого осаду не повинна перевищувати 0,03 г (30 мг). Якщо вага більша, осад не повністю висихає навіть за умов тривалого сушіння, і буде отримана значна похибка у визначенні.

Загальна схема аналізу екстракту № 2 така сама, як і екстракту № 1, але до проведення реакції омилення лугом цей екстракт потрібно нейтралізувати 0,4 % розчином гідроксиду натрію, використовуючи як індикатор 0,1 % розчин фенолфталеїну.

Вміст пектинових речовин у перерахунку на пектинову кислоту розраховують за формулою:

$$x = \frac{V \times P \times 100 \times 0,9235}{n \times V_1},$$

де:

x – вміст пектинової кислоти в рослинному матеріалі, %;

V – загальний об'єм екстракту, мл;

V_1 – об'єм проби, який було взято для осадження пектату, мл;

P – маса осаду пектату кальцію, г;

n – наважка рослинного матеріалу, г,

0,9235 – коефіцієнт для перерахунку пектату кальцію у пектинову кислоту.

Обладнання

1) мірчі та конічні колби об'ємом 250 мл; 2) мірчі колби об'ємом 500 мл; 3) мірчі циліндри об'ємом 50 та 100 мл; 4) піпетки об'ємом 1, 5 та 10 мл; 5) водяна баня; 6) ступки з товкачиками; 7) сушильна шафа; 8) центрифуга та центрифугальні пробірки; 9) апарат для струшування; 10) електрична плита; 11) металеві бюкси.

Реактиви

1) соляна кислота (HCl) 0,3 N розчин; 2) цитрат натрію ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) 1 % розчин; 3) гідроксид натрію (NaOH) 0,4 % розчин; 4) оцтова кислота (CH_3COOH) 6 % розчин; 5) хлорид кальцію (CaCl_2) 0,5 % та 11,1 % розчини.

ПИТАННЯ ДЛЯ ПЕРЕВІРКИ ЗНАНЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Що таке пектинові речовини (хімічна будова, фізичні властивості)?
2. Яке значення пектинових речовин у рослинах?
3. Як використовуються пектинові речовини в господарській діяльності людини?
4. На чому оснований принцип методу визначення пектинових речовин у рослинах?
5. Із якою метою і як проводиться обробка дослідного матеріалу етиловим спиртом?
6. Які пектинові речовини містяться у витяжках № 1 та № 2?
7. Що таке омилання? З якою метою і як проводиться омилання пектинових речовин?
8. Яка залежність існує між кількістю розчину тіосульфату натрію, що використовується на титрування, та вмістом целюлози в дослідному зразку?

7. АНАЛІЗ ЛІПІДІВ РОСЛИН

РОБОТА 7.1. ЕКСТРАКЦІЯ СУМАРНИХ ЛІПІДІВ ІЗ РОСЛИННИХ ТКАНИН

Принцип методу. Для вилучення ліпідів із нефотосинтезуючих рослинних тканин або з фотосинтезуючих тканин, що містять ферменти, які легко дезактивуються, застосовують модифікований метод Блая і Дайера, в основі якого лежить використання полярного і неполярного розчинників у суміші, що дає змогу зруйнувати ліпопротеїдні комплекси і провести повне вилучення зв'язаних ліпідів.

Перебіг аналізу. Наважку 0,2 г розтертої рослинної тканини заливають 8 мл суміші хлороформ–метанол (1 : 2 за об'ємом), гомогенізують 2 хв, після чого центрифугують 5 хв за швидкості 3 500 об./хв. Надосадову рідину переносять у ділильну лійку. У пробірку з осадом доливають 9 мл суміші хлороформ–метанол–вода у співвідношенні 1 : 2 : 0,8, повторно гомогенізують та центрифугують. Надосадову рідину переносять у ділильну лійку, об'єднуючи з попередньою порцією надосадової рідини. Додають 8 мл суміші хлороформу та дистильованої води, струшують і залишають стояти для розділення хлороформного та водно-метанольного шарів. Нижній хлороформний шар збирають, додають безводний Na_2SO_4 та залишають на ніч у холодильнику. Хлороформний шар фільтрують та концентрують у потоці азоту, після чого додають 100 мкл гексану. Розраховують концентрацію сумарних ліпідів у дослідному зразку.

Обладнання

1) мірчі колби; 2) хімічні склянки; 3) пробірки; 4) піпетки; 5) фарфорова ступка; 6) кварцовий пісок; 7) ділильна лійка; 8) паперові фільтри; 9) бюкси; 10) спектрофотометр СФ-46; 11) центрифуга; 12) водяна баня; 13) термометр.

Реактиви

1) хлороформ (CHCl_3); 2) метанол (CH_3OH); 3) сульфат натрію (Na_2SO_4) безводний; 4) гексан (C_6H_{14}); 5) дистильована вода.

ПИТАННЯ ДЛЯ ПЕРЕВІРКИ ЗНАНЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Наведіть характеристику рослинних ліпідів. Які особливості будови та складу ліпідів у рослинах?
2. Характеризуйте принцип методу визначення ліпідів у рослинному матеріалі.
3. Наведіть послідовність виконання аналізу.

РОБОТА 7.2. ВИЗНАЧЕННЯ МАСОВОЇ ЧАСТКИ ЖИРІВ МЕТОДОМ ВИЧЕРПНОЇ ЕКСТРАКЦІЇ

Принцип методу. Метод оснований на визначенні масової частки ліпідів в аналізованому матеріалі за масою їх речовин, екстрагованих діетиловим або петролейним ефіром у апараті Сокслета. Апарат Сокслета складається з трьох частин: екстрактора, приймальної колби і зворотного холодильника (рис. 24). Усі частини апарата щільно приєднані одна до одної за допомогою шліфів. Основна деталь насадки – екстрактор – є циліндричною ємністю, обладнаною двома бічними трубками. Більш широка трубка слугує для відведення пари розчинника (ефіру) в холодильник, більш тонка – є сифоном, що відводить розчин ліпідів у приймальну колбу.

Перебіг аналізу. Вода, що міститься у тканинах матеріалу, заважає дифузії жиру з продукту в розчинник, тому зразок продукту необхідно підсушити або зневоднити. Вміст вологи підсушеного зразку повинен бути приблизно 3–3,5 %. Далі підсушену пробу продукту подрібнюють у ступці вручну або за допомогою електричного млина. Першу порцію продукту, подрібненого у млині, відкидають, оскільки олія, що виділилась під час подрібнення, витрачається на заоліювання робочих органів млина. Усі подальші порції подрібненого продукту примішують у склянку місткістю 250 мл і ретельно перемішують шпателем.

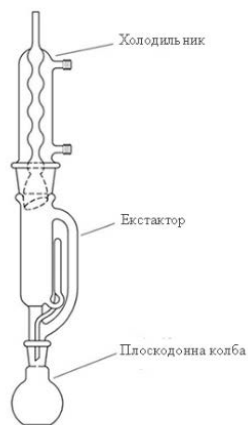


Рис. 24. Апарат Сокслета

Патрони для насадок екстракторів Сокслета готують із аркушу фільтрувального паперу розміром 110 × 500 мм, знежиреного діетиловим або петролейним ефіром у такий спосіб: на дерев'яну циліндричну болванку намотують фільтрувальний папір так, щоб з одного боку болванки край паперу виступав на 2–2,5 см. Цю частину паперу загинають, намотуючи її на болванку пінцетом, далі патрон придавлюють із торця об пласку поверхню і знімають із болванки.

У патрон кладуть два шматочки знежиреної вати (на дно патрона та зверху) і зважують на аналітичних терезах із записом результатів до четвертого десяткового знака. Із перемішаної маси подрібненого продукту беруть наважку 5–10 г у два заздалегідь підготовані для екстракції патрони, зверху кладуть другий шматочок вати та загинають верхні краї патронів усередину. Зважування патронів із наважкою продукту проводять

на аналітичних терезах із записом результатів до четвертого десяткового знака. Висота патрона з наважкою повинна бути такою, щоб верхній край сифона екстрактора Сокслета був на 1 см вищим за патрон.

Патрони з наважкою продукту кладуть в екстрактор. До екстрактора приєднують знежирену колбу, заздалегідь висушену до постійної маси за температури 102–105 °С. Наливають в екстрактор розчинник так, щоб патрон у ньому був повністю покритий шаром ефіру. У колбу наливають ефір на 1/3 її об'єму. Після з'єднання всіх частин апарата подають холодну воду в холодильник і підігрівують колбу, використовуючи водяну баню або інші пристрої, які виключають спалахування розчинника. Слідкують за рівномірністю кипіння в колбі. Пари киплячого ефіру проходять трубкою в холодильник, конденсуються, і ефір краплями стікає до патронів із продуктом, що екстрагується. Екстрактор поступово наповнюється рідким ефіром, ліпіди вилучаються з пробки продукту. Як тільки рівень ефіру в екстракторі підніметься дещо вище верхнього коліна сифонної трубки, він зливається через сифон у колбу. Там, нагріваючись, ефір перетворюється на пари, які знову підіймаються в холодильник і, конденсуючись, стікають в екстрактор. Ліпіди збираються в колбі. Початком екстракції вважається той момент, коли розчинник і насадки екстрактора зіллється у приймальну колбу другий раз. Після цього екстракцію ведуть безперервно. Якщо неможливо організувати цілодобову роботу лабораторії, то екстракцію переривають, вимикаючи обігрів водяної бані, а патрони в екстракторах повинні залишатися в шарі розчинника. Коли пройде приблизно половина часу екстрагування, патрони в екстракторі перевертають. Розчинник через екстрактор повинен сифонувати не менше 7–8 разів на годину. Про закінчення екстрагування можна судити за відсутністю жирної плями на фільтрувальному папері або скляній пластинці під час випаровування нанесеної на них краплі розчинника, що стікає з екстрактора. Повноту екстракції можна також перевірити, примішуючи краплю розчинника з екстрактора на шорстку сторону шліфованої частини шийки колби. Якщо після висихання краплі на шліфі не залишається слідів олії, то екстракція вважається закінченою. Після закінчення екстрагування припиняють нагрівати колбу, дають їй охолонути, вимикають воду і прибирають холодильник. Далі, нахиливши екстрактор, зливають у приймальну колбу через сифонну трубку ефір, що залишився в ньому, і відділяють колбу від екстрактора.

Для відгонки ефіру колбу з розчином жиру приєднують до апарата для відгонки. Колба з розчином сполучена з прямим холодильником, форштос опущений у приймач для розчинника вільно, без пробки. Остаточне видалення ефіру і висушування ліпідів проводять в електричній сушильній шафі з терморегулятором за температури 102–105 °С до постійної маси. Перше зважування проводять через 1,5 год, подальші – через 30 хв. Колби з ліпідами після їх охолодження в

екстракторі протягом 45–60 хв зважують. Під час зважування колб до і після висушування використовують один і той самий набір гир. Якщо під час чергового зважування маса колби з ліпідами збільшується, що можливе внаслідок окислення жиру, то за постійну масу приймають найменшу.

Одночасно визначають вміст води у продукті методом висушування до постійної маси за температури 102–105 °С. Для цього в заздалегідь висушені у тих самих умовах металеві або скляні склянки беруть із подрібненої маси продукту дві наважки масою приблизно 5 г. Перше зважування проводять через 1 год, подальші – через 30 хв. Перед зважуванням склянки з наважками охолоджують в ексікаторі. Усі зважування – патронів із наважкою продукту, колб із ліпідами, склянок під час визначення води – проводять на терезах 2 класу із записом результатів до четвертого десяткового знака.

Масову частку жиру (%) до маси продукту розраховують за формулою:

$$M = 100 \times \frac{m - m_1}{m_2},$$

де:

M – вміст ліпідів, %;

m – маса колби з ліпідами, г;

m_1 – маса порожньої колби, г;

m_2 – маса наважки подрібненого продукту, г.

Для визначення вмісту жиру за масою знежиреного залишку (метод С. В. Рушковського) масову частку жиру (%) до маси продукту розраховують так:

$$M = 100 \times \frac{m - m_1}{m_2},$$

де:

M – вміст ліпідів, %;

m – маса патрону з наважкою продукту до екстракції, г;

m_1 – маса патрону з наважкою продукту після екстракції, г;

m_2 – маса наважки подрібненого продукту (різниця між масою патрону з наважкою до екстракції та порожнього патрону з двома шматочками вати), г.

Масову частку жирів у продукті на масу сухої речовини розраховують за формулою:

$$M_c = \frac{M \times 100}{100 - W},$$

де:

M_c – масова частка жирів, %;

M – масова частка олій в подрібненому і підсушеному насінні, %;

W – вміст води у подрібненому після підсушування насінні, %.

За результат аналізу приймають середнє арифметичне двох паралельних визначень масової частки жиру окремих проб продукту. Обчислення проводять до другого десяткового знака, результат записують із точністю до першого десяткового знака. Розбіжності між паралельними визначеннями не повинні перевищувати 0,5 %.

Обладнання

1) терези лабораторні 2-го класу; 2) насадки типу НЕТ для екстрагування лабораторні скляні об'ємом 250 мл; 3) сушильна шафа з терморегулятором; 4) ексикатор об'ємом 190 або 250 мл; 5) водяна баня з виносним обігрівом; 6) лабораторний млин; 7) скляні бюкси діаметром 30 або 40 мм; 8) шпателі; 9) пінцети; 10) дерев'яна циліндрична болванка діаметром 25 мм і завдовжки 150 мм; 11) фарфорові чашки об'ємом 100 або 250 мл.

Реактиви

1) діетиловий або петролейний ефір; 2) хлорид кальцію (CaCl_2).

ПИТАННЯ ДЛЯ ПЕРЕВІРКИ ЗНАТЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Охарактеризуйте рослинні жири. Чим рослинні олії відрізняються від тваринних жирів?

2. Наведіть принцип методу визначення вмісту рослинних жирів методом екстракції. Опишіть апарат Сокслета.

3. Наведіть послідовність операцій під час визначення вмісту рослинних жирів.

4. Як обчислюється вміст жирів та масова частка жирів у рослинному матеріалі?

РОБОТА 7.3. РЕФРАКТОМЕТРИЧНИЙ МЕТОД ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ЛІПІДІВ

Принцип методу. Метод базується на вилученні жиру безпосередньо з наважки або наважки, попередньо обробленої оцтовою кислотою та монобромнафталіном або монохлорнафталіном із наступним визначенням концентрації жиру в розчині за показником заломлення. Метод використовується для продуктів із вмістом жиру від 1 % до 70 %.

Перебіг аналізу. Маса наважки матеріалу, яка вимагає обробки оцтовою кислотою, складає $1,5 \pm 0,1$ г. Наважку зважують із точністю до 0,001 г, примішують у фарфорову ступку та додають 0,5 мл гарячої дистильованої води. Фарфорову ступку ставлять на гарячу водяну баню, а далі охолоджують до кімнатної температури, після чого додають приблизно 1 г підготовленого піску і 1 мл розчину оцтової кислоти з масовою часткою 80 %. Суміш ретельно розтирають товкачиком протягом 2 хв.



*Рис. 25. Рефрактометр
ИРФ-454Б2М*

Перевірка нульової точки шкали рефрактометра. Нульову точку рефрактометра перевіряють, використовуючи дистильовану воду. Для цього від 1 до 2 крапель дистильованої води наносять на призму рефрактометра. Окуляр шкали і окуляр зорової труби наводять на різкість. Візирну лінію окуляра шкали встановлюють на 1,333 (показник заломлення дистильованої води за 20 °C) і через зорову трубу спостерігають за межею світлотіні відносно точки перетину двох взаємно перпендикулярних візирних ліній. Як

що межа світлотіні проходить через точку перетину візирних ліній, то шкалу приладу виставлено на нуль. У протилежному разі за допомогою спеціального ключа і гвинта суміщають точку перетину прямих із межею світлотіні. Перевірку приладу проводять за температури призм, що дорівнює 20 °C. Температуру призм встановлюють за допомогою пропускання води заданої температури через термостатуючі камери рефрактометра.

Визначення показника заломлення розчинника. Для кожної партії монобром- або моноклорнафталіну за допомогою рефрактометра визначають показник заломлення за температури $20 \pm 0,1$ °C з точністю до 0,0001, наносячи на суху призму рефрактометра від 1 до 2 крапель розчинника.

Визначення густини розчинника. Визначення густини розчинника здійснюють для кожної партії розчинника. Висушений до постійної маси за температури від 100 °C до 105 °C і охолоджений в ексикаторі до кімнатної температури пікнометр зважують з точністю до 0,0015 г, наповнюють дистильованою водою до рівня, дещо вищого за позначку. Пікнометр закривають пробкою і витримують у термостаті за температури 20 °C протягом 20 хв. За цієї температури рівень води в пікнометрі доводять до позначки за допомогою капілярної трубки або згорнутого в трубочку фільтрувального паперу. Після цього пікнометр знову витримують у термостаті за тієї самої температури протягом 10 хв, перевіряючи положення меніска відносно позначки. Після цього пікнометр ззовні протирають насухо м'якою тканиною, залишають під склом аналітичних терезів протягом 20 хв і зважують із точністю до 0,0015 г. Після зважування воду із пікнометра виливають, пікнометр споліскують етиловим спиртом та діетиловим ефіром, висушують до постійної маси та охолоджують в ексикаторі до кімнатної температури. Сухий охолоджений пікнометр наповнюють досліджуваним розчинником, витримують у термостаті за температури 20 °C протягом 20 хв, доводять вміст до позначки розчинником, залишають під склом аналітичних терезів протягом 20 хв і зважують із точністю до 0,0015 г. Наповнення пікно-

метра водою (або розчинником), вирівнювання меніска та зважування повторюють тричі. Розбіжність між паралельними зважуваннями не повинна бути більшою за 0,005 г. Для розрахунків беруть середню арифметичну величину. Густину розчинника в кілограмах на метр кубічний розраховують за формулою:

$$\rho^{20} = \frac{(m_2 - m) \times 998,23}{m_1 - m},$$

де:

ρ^{20} – густина розчинника, кг/м³;

m – маса пустого пікнометра, г;

m_1 – маса пікнометра з дистильованою водою, г;

m_2 – маса пікнометру з розчинником, г;

998,23 – значення густини води за температури 20 °С, кг/м³.

Остаточний результат заокруглюють до цілого числа.

Градуювання піпетки за розчинником. Градування здійснюють для кожної піпетки, що застосовується. Для градування піпетки місткістю 2 мл відмірюють нею відповідний об'єм монобром- або монохлорнафталіну, виливають його в попередньо зважену колбу з притертою пробкою або склянку для зважування і зважують із точністю до 0,0015 г. Дозування та зважування повторюють тричі, розбіжність між ними не повинна бути більшою за 0,005 г. Для розрахунків беруть середнє арифметичне значення. Об'єм розчинника в мілілітрах розраховують за формулою:

$$V_p = \frac{m_3}{\rho^{20}} \times 1\,000,$$

де:

m_3 – маса розчинника, що відповідає об'єму піпетки, г;

ρ^{20} – густина розчинника, кг/м³;

1 000 – коефіцієнт для перерахунку у сантиметри кубічні.

Остаточний результат заокруглюють до третього десяткового знака.

Проведення аналізу. У фарфорову ступку з наважкою, яку не обробляли оцтовою кислотою, додають 2 мл монохлор- або монобромнафталіну проградуюваною піпеткою і розтирають товкачиком протягом 3 хв. До наважки, яку обробляли оцтовою кислотою, крім розчинника, додають 1 г вуглекислого натрію і знову ретельно розмішують протягом 1 хв. Суміш фільтрують крізь паперовий фільтр у склянку місткістю 25 або 50 мл. Фільтрат розмішують скляною паличкою. Дві краплі фільтрату наносять на призму рефрактометра за температури 20 °С і визначають показник заломлення. Для запобігання випаровування розчинника тривалість фільтрування і визначення показника заломлення повинна бути не більшою 30 хв. Показник заломлення визначають не менше трьох разів і за результат приймають середнє арифметичне значення. Проводять два вимі-

рювання на дослідних наважках, взятих з одної і тої самої проби. Розраховують масову частку жиру у відсотках за такою формулою:

$$\omega = \frac{V_p \times \rho_{\text{ж}}^{20}}{m \times 100} \times \frac{n_p^{20} - n_{\text{рж}}^{20}}{n_{\text{рж}}^{20} - n_{\text{ж}}^{20}} \times 100,$$

де:

ω – масова частка жиру, %;

V_p – об'єм розчинника, який взяли для екстрагування жиру з наважки про-
дукту, мл;

$\rho_{\text{ж}}^{20}$ – густина жиру за 20 °С, кг/м³;

n_p^{20} – показник заломлення розчинника за 20 °С;

$n_{\text{рж}}^{20}$ – показник заломлення розчину жиру в монохлор- або монобромнаф-
таліні за 20 °С;

$n_{\text{ж}}^{20}$ – показник заломлення жиру за 20 °С;

m – маса наважки виробу, г.

1 000 – коефіцієнт для перерахунку кг/м³ у г/см³;

100 – коефіцієнт для перерахунку результату у відсотки.

Результати паралельних визначень розраховують до другого десяткового знака. За кінцевий результат приймають середнє арифметичне результатів двох паралельних визначень, розбіжність між якими не перевищує умови збіжності методу та округлюють до першого десяткового знака. Границі абсолютної похиб-
ки вимірювань становлять $\pm 0,5$ %.

Обладнання

1) аналітичні терези не нижче 2 класу точності; 2) сушильна шафа; 3) ре-
фрактометр для вимірювання показника заломлення від 1,3000 до 1,7000 з ціною по-
ділки шкали не більше за 0,0002; 4) термометр рідинний скляний з ціною по-
ділки шкали 1° С і діапазоном вимірювання температури від 0 до 150° С; 5) се-
кундомір або годинник; 6) піпетки 1 або 2 класу точності об'ємом 2 мл; 7) рідин-
ний термостат, що забезпечує температуру 20 $\pm$ 0,1 °С; 8) муфельна піч; 9) ступка
фарфорова з товкачиком або чашка виварювальна діаметром не більше 70 мм;
10) колби з притертою пробкою об'ємом 25, 50 та 100 мл; 11) пікнометр з гор-
ловиною діаметром 6 мм об'ємом 25 та 50 мл; 12) склянки лабораторні об'ємом
25, 50 та 500 мл; 13) лійки скляні діаметром не більше 40 мм; 14) папір фільтру-
вальний; 15) сито для просіювання піску з отворами діаметром від 1,0 до 1,5 мм.

Реактиви

1) α -бромнафталін (монобромнафталін) з показником заломлення приблиз-
но 1,66 або α -хлорнафталін (монохлорнафталін) з показником заломлення при-
близно 1,63; 2) ефір петролейний з температурою кипіння від 30 °С до 60 °С;
3) кислота оцтова (CH₃COH) х. ч. 80 % розчин; 4) кислота соляна (HCl) х. ч.

10 % розчин; 5) карбонат натрію (Na_2CO_3) безводний х. ч.; 6) метилоранж; 7) вода дистильована; 8) пісок річковий очищений прожарений.

Приготування реактивів

Реактив № 8. Пісок просівають крізь сито, промивають водопровідною водою. Промитий пісок переносять у склянку місткістю 500 см^3 і заливають розчином соляної кислоти з масовою часткою 10 %. Періодично помішуючи шпателем, залишають на період від 10 год до 12 год. Після цього розчин кислоти зливають. Промивають пісок водопровідною водою методом декантації до нейтральної реакції промивної води (перевіряють метилоранжем), далі дистильованою водою, просушують у сушильній шафі за температури $(115 \pm 3)^\circ\text{C}$ і прожарюють в муфельній печі за температури $500\text{--}600^\circ\text{C}$. Зберігають пісок у тарі зі щільно закритою кришкою.

ПИТАННЯ ДЛЯ ПЕРЕВІРКИ ЗНАТЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Охарактеризуйте принцип рефрактометричного визначення масової частки жирів.
2. Наведіть способи калібрування обладнання для проведення аналізу.
3. Як проводиться визначення показників заломлення. Від чого вони залежать?

РОБОТА 7.4. РЕФРАКТОМЕТРИЧНИЙ МЕТОД ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ЖИРІВ У ОЛІЙНОМУ НАСІННІ

Принцип методу. Принцип методу полягає в тому, що під час розчинення ліпідів коефіцієнт заломлення розчинника знижується пропорційно до кількості вилученого розчинником жиру. За різницею між коефіцієнтами заломлення чистого розчинника і розчину жиру в розчиннику визначають масову частку жирів у продукті.

Перебіг аналізу. Пробу насіння підсушують у сушильній шафі до вологості не більше ніж 4 % та подрібнюють ручним або механічним способом до однорідного стану. Далі подрібнену пробу продукту перемішують і беруть наважку масою 2 г для визначення вологи шляхом висушування за температури 130°C протягом 20 хв. Для визначення масової частки жиру беруть наважку подрібненого продукту масою 5 г, переносять у фарфорову ступку (або чашку), додають 3 г піску і з бюретки доливають 5 мл розчинника (α -бромнафталіну або α -хлорнафталіну). Пісок повинен бути заздалегідь просіяний, оброблений сірчаною кислотою, ретельно промитий і прожарений. Для роботи застосовують фракцію, що залишилася на 0,5-міліметровому ситі і яка пройшла через сито з отворами діаметром 1 мм. Необхідну кількість піску (2–3 г) можна зважити один раз, а надалі

відповідний об'єм піску достатньо відміряти пробіркою. Суміш подрібненого продукту з піском і розчинником ретельно розтирають протягом 3 хв (за секундоміром), далі з тієї самої бюретки додають ще 15 мл розчинника і вміст ступки розмішують 2–3 хв. Загальний об'єм доданого розчинника повинен складати точно 20 мл.

Розчин фільтрують через паперовий складчастий фільтр і визначають за допомогою рефрактометра коефіцієнт заломлення розчину. Визначення коефіцієнтів заломлення чистого розчинника і профільтованого розчину жиру в розчиннику проводять відповідно до інструкції, прикладеної до рефрактометра. Одночасне визначення коефіцієнтів заломлення виключає необхідність термостатування приладу. Масову частку жиру у продукті визначають за формулою:

$$M = \frac{a + b \times \Delta n}{\Delta n},$$

де:

M – масова частка жиру, %;

a – коефіцієнт, що показує, яка масова частка жиру (%) доводиться на 0,0001Δn для цього розчинника $a = X/\Delta n$;

X – масова частка жиру, знайдена методом вичерпної екстракції, %;

Δn – різниця між коефіцієнтами заломлення чистого розчинника і розчину жиру в розчиннику;

b – постійний коефіцієнт, який враховує відхилення показника заломлення розчину від правила змішування, його значення: для бромнафталіну $b = 12\,380$; для хлорнафталіну $b = 16\,900$.

Для встановлення коефіцієнта **a** беруть п'ять зразків насіння, виділяють середні об'єми проб, як вказано вище, і проводять визначення масової частки жиру методом вичерпної екстракції і одночасно рефрактометричним методом (у цьому разі немає необхідності визначати вологість продукту).

Обладнання

1) рефрактометр із граничним коефіцієнтом заломлення до 1,7; 2) пікнометр скляний об'ємом 25 або 50 мл; 3) терези лабораторні 4-го класу; 4) фарфорова ступка діаметром 70 мм чи фарфорова чашка ємністю 50 або 100 мл; 5) склянки скляні об'ємом 25 або 50 мл; 6) лійки діаметром 25 мм; 7) піпетки об'ємом 2 мл з поділками 0,02 мл; 8) беззольні фільтри або папір фільтрувальний.

Реактиви

1) α-бромнафталін з коефіцієнтом заломлення близько 1,66 або α-хлорнафталін з коефіцієнтом заломлення близько 1,63; 2) сірчана кислота (H₂SO₄); 3) пісок.

ПИТАННЯ ДЛЯ ПЕРЕВІРКИ ЗНАТЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Чим характеризуються рослини, насіння яких містить жири (олії)? Наведіть приклади таких рослин.
2. Як утилізуються запасні олії під час проростання насіння?
3. Наведіть етапи виконання аналізу.
4. Дайте характеристику роботи з рефрактометром. Для чого застосовується цей прилад?
5. Яка залежність існує між вмістом жирів у рослинному насінні та показниками заломлення?

РОБОТА 7.5. ВИЗНАЧЕННЯ КИСЛОТНОГО ЧИСЛА СВІТЛИХ ОЛІЙ

Принцип методу. Метод оснований на титруванні (нейтралізації) вільних жирних кислот лугом у присутності індикатору.

Перебіг аналізу. У колбу зважують 4–5 г олії із записом результату до другого десяткового знака і додають 50 мл суміші етанолу з етиловим ефіром, додають 3–5 крапель розчину фенолфталеїну. Отриманий розчин за постійного перемішування титрують із бюретки розчином гідроксиду калію або натрію до отримання слабо-рожевого забарвлення, яке не зникає протягом 30 с. Кислотне число обчислюють за формулою:

$$A = \frac{5,611 \times V \times K}{n},$$

де:

A – кислотне число олії;

5,611 – титр 0,1 N розчину гідроксиду калію, мг/мл;

V – об'єм 0,1 N розчину лугу, витрачений на титрування, мл;

K – поправка до титру;

n – маса наважки олії, г.

Обладнання

1) терези лабораторні 4-го класу; 2) бюретка зі штативом; 3) колби конічні плоскодонні об'ємом 100 мл.

Реактиви

1) гідроксид калію (KOH) або натрію (NaOH) 0,1 N розчин у етанолі; 2) фенолфталеїн 1 % розчин у етанолі; 3) нейтралізована суміш 96 % етанолу з етиловим ефіром (1 : 2).

ПИТАННЯ ДЛЯ ПЕРЕВІРКИ ЗНАТЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Наведіть характеристику кислотного числа жиру. Одиниці виміру.
2. Як відбувається реакція нейтралізації вільних жирних кислот?

3. Принцип методу визначення кислотного числа жиру.
4. Наведіть послідовність аналізу визначення кислотного числа жиру.
5. Які реактиви використовують для визначення кислотного числа олії і яку функцію виконує кожен реактив?

РОБОТА 7.6. ВИЗНАЧЕННЯ КИСЛОТНОГО ЧИСЛА ТЕМНИХ ОЛІЙ

Принцип методу. Під час визначення кислотного числа темнозабарвлених олій описаним вище способом через темне забарвлення розчину важко встановити момент зміни забарвлення індикатору. Тому для темних олій визначення кислотного числа проводять сольовим методом або методом потенціометричного титрування.

Сольовий метод – це візуальний метод, за якого закінчення титрування визначається за зміною забарвлення сольового розчину. Метод оснований на нейтралізації вільних жирних кислот лугом, але органічні розчинники для олії не застосовують, реакцію нейтралізації ведуть у насиченому нейтральному розчині хлориду натрію. Після нейтралізації всіх вільних жирних кислот надмірна кількість лугу переходить у розчин кухарської солі і забарвлює його у присутності фенолфталеїну у світло-рожевий колір.

Перебіг аналізу. Зважують наважку приблизно 10 г олії і примішують у конічну колбу об'ємом 250 мл, яка має пришліфовану пробку. До олії додають 50–60 мл насиченого нейтралізованого розчину хлориду натрію і 0,5 мл 1 % спиртового розчину фенолфталеїну. Колбу закривають пробкою, струшують і вміст титрують 0,1 N водним розчином КОН (за умови високого кислотного числа можна застосовувати 0,25 N розчин КОН). Під час титрування суміш постійно струшують після додавання кожних 4–5 крапель лугу до тих пір, поки не зникне забарвлення нижнього шару рідини. Якщо після чергового струшування забарвлення почне поволі зникати, колбу струшують після додавання 1–2 крапель розчину лугу. Титрування ведуть до появи стійкого рожевого забарвлення нижнього шару рідини. Кислотне число розраховують за формулою:

$$A = \frac{5,611 \times V \times K}{n},$$

де:

A – кислотне число олії;

5,611 – титр 0,1 N розчину гідроксиду калію, мг/мл;

V – об'єм 0,1 N розчину лугу, витрачений на титрування, мл;

K – поправка до титру;

n – маса наважки олії, г.

Обладнання

1) терези лабораторні 4-го класу; 2) бюретка зі штативом; 3) колби конічні плоскодонні з пришліфованими пробками об'ємом 250 мл.

Реактиви

1) хлорид натрію (NaCl) насичений нейтралізований розчин; 2) фенолфталеїн 1 % розчин у етанолі; 3) гідроксид калію (KOH) 0,1 N водний розчин.

ПИТАННЯ ДЛЯ ПЕРЕВІРКИ ЗНАЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Наведіть принцип методу визначення кислотного числа жиру у темнозабарвлених оліях.
2. Як проходить реакція нейтралізації вільних жирних кислот?
3. Наведіть порядок визначення кислотного числа.
4. Які реактиви використовують для визначення кислотного числа олії і яку функцію виконує кожен реактив?
5. Як проводиться розрахунок кислотного числа олій?

РОБОТА 7.7. ВИЗНАЧЕННЯ КИСЛОТНОГО ЧИСЛА ОЛІЇ В НАСІННІ

Принцип методу. Кількість вільних жирних кислот залежить від якості насіння та умов розвитку рослин, умов його збирання. Принцип методу базується на титруванні (нейтралізації) вільних жирних кислот, які містяться у вилученій з насіння олії, лугом у присутності індикатору – фенолфталеїну.

Для визначення кислотного числа олія з насіння може бути вилучена:

- настоюванням подрібненого насіння з розчинником;
- екстракцією олії в апараті Сокслета;
- пресуванням цілого насіння на лабораторному гідравлічному пресі.

Перебіг аналізу. Вилучення олії з насіння проводять настоюванням із діетиловим ефіром. Для цього приблизно 50 г подрібненого насіння вносять у конічну колбу та заливають 150–200 мл діетилового ефіру. Колбу закривають пробкою та витримують протягом 2 год за кімнатної температури, час від часу струшуючи її. Далі суспензію фільтрують, відбирають піпеткою по 25 мл фільтрату та переносять його у дві конічні колби, куди додають по 15 мл попередньо нейтралізованого (0,1 N розчином луку у присутності фенолфталеїну) етилового спирту. Суміш титрують 0,1 N розчином KOH у присутності 3–5 крапель 1 % розчину фенолфталеїну в етанолі до слабо-рожевого забарвлення. Одночасно відбирають по 25 мл фільтрату у дві попередньо висушені та зважені колби, відганяють ефір, висушують олію за 90–95 °C до постійної маси та визначають кількість олії (у грамах, яка міститься в 25 мл фільтрату). Кислотне число олії в насінні визначають за формулою:

$$A = \frac{5,611 \times V \times K}{P},$$

де:

V – середня кількість мл 0,1 N розчину луку, яка використана для титрування;

K – поправка до титру, 0,1 н розчину КОН;

P – середня маса олії, яка міститься у 25 мл фільтрату, г.

Можна також для отримання олії у насінні використовувати *екстракцію її у апараті Сокслета*. Для цього приблизно 30 г подрібненого насіння вносять у патрони та екстрагують діетиловим ефіром в апараті Сокслета протягом 1 год. Далі з отриманого ефірного екстракту відбирають піпеткою по 25 мл у дві колби: одну для титрування та іншу, висушену та зважену, – для визначення маси олії у 25 мл екстракту. Маса олії повинна бути не меншою за 0,5 г. Подальший перебіг аналізу такий самий, як і в попередньому методі вилучення олії.

Обладнання

1) апарат Сокслета; 2) колби конічні об'ємом 100 та 250 мл; 3) піпетки на 25 мл; 4) бюретки; 5) терези лабораторні 2-го та 4-го класу; 6) сушильна шафа.

Реактиви

1) гідроксид калію (КОН) 0,1 N розчин; 2) фенолфталеїн 1 % розчин у етанолі; 3) діетиловий ефір; 4) етанол нейтралізований.

ПИТАННЯ ДЛЯ ПЕРЕВІРКИ ЗНАТЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Охарактеризуйте принцип методу визначення кислотного числа олій насіння.
2. Як відбувається реакція нейтралізації вільних жирних кислот?
3. Якими способами можна вилучити олію з насінневого матеріалу?
4. Які реактиви використовують для визначення кислотного числа олії і яку функцію виконує кожен реактив?

РОБОТА 7.8. ВИЗНАЧЕННЯ ПЕРОКСИДНОГО ЧИСЛА ЖИРІВ ТА ОЛІЙ (ДСТУ 4570:2006)

Принцип методу. Пероксидне число – відношення кількості речовин у пробі, у перерахунку на активний кисень, які за стандартних умов окислюють йодид калію, до маси дослідної проби. Характеризує кількість первинних продуктів окислення жирів – пероксидних сполук (гідропероксидів, пероксидів, діалкілпероксидів), які здатні виділяти з водного розчину йодиду калію йод. Виражається у мілімолях активного кисню на кілограм проби. Пероксидне число є показником ступеня свіжості олій та жирів.

Принцип методу ґрунтується на реакції взаємодії продуктів окислення олій та жирів (пероксидів та гідропероксидів) із йодидом калію у розчині оцтової кислоти і хлороформу та подальшому кількісному визначенні йоду, що виділився, розчином тіосульфату натрію титриметричним методом.

Перебіг аналізу. Якщо олія прозора, пробу олії, яка призначена для аналізу, добре перемішують. За наявності в олії каламутності або осаду пробу фільтрують за температури 20 °С. Пробу олії можна зберігати у холодильнику в ємності з темного скла із притертою пробкою не більше ніж 5 днів. Масу проби, необхідну для дослідження, залежно від передбачуваних пероксидних чисел визначають згідно з таблицею 1.

Таблиця 1. Залежність величини дослідної проби від передбачуваного пероксидного числа

Передбачувані значення пероксидних чисел, ммоль ½ О/кг	Маса досліджуваної проби, г
від 0 до 6,0	5,000 – 2,000
6,0 до 10,0	2,000 – 1,200
10,0 до 15,0	1,200 – 0,600
15,0 до 25,0	0,600 – 0,500
25,0 до 40,0	0,500 – 0,300

Пробу олії або жиру зважують і приміщують у конічну колбу. У колбу додають 10 мл хлороформу, швидко розчиняють дослідну пробу, доливають 15 мл оцтової кислоти та 1 мл розчину йодиду калію, після чого колбу відразу закривають пробкою. Вміст колби перемішують протягом 1 хв і залишають на 5 хв у темному місці за температури від 15 °С до 25 °С. Після цього додають 75 мл дистильованої води, ретельно перемішують і додають розчин крохмалю до появи слабкого однорідного фіолетово-синього забарвлення. Йод, що виділився, титрують розчином тіосульфату натрію до зникнення фіолетово-синього забарвлення і появи молочно-білої забарвленості, стійкої протягом 5 с. Концентрацію розчину тіосульфату натрію обирають залежно від передбачуваного значення пероксидного числа: більше ніж 6,0 ммоль ½ О/кг використовують розчин тіосульфату натрію молярної концентрації ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) = 0,01 моль/л, менше 6,0 ммоль ½ О/кг титрують розчином тіосульфату натрію молярної концентрації ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) = 0,002 моль/л. Якщо на титрування витрачається менше 0,5 мл розчину тіосульфату натрію концентрацією 0,01 моль/л, повторюють титрування розчином тіосульфату натрію концентрацією 0,002 моль/л з енергійним перемішуванням. Якщо очікуване пероксидне число менше ніж 1,0 ммоль ½ О/кг, то для титрування рекомендовано використання бюретки об'ємом 5 мл.

Паралельно роблять контрольний дослід без дослідної проби олії чи жиру. Якщо у контрольному досліді на титрування витрачено понад 0,1 мл 0,01 моль/л розчину тіосульфату натрію, то перевіряють відповідність реактивів вимогам стандартів і повторюють випробування.

Пероксидне число в $\frac{1}{2}$ О ммоль/кг обчислюють за формулою:

$$A = \frac{1\,000 \times (V - V_0)}{n} \times C,$$

де:

A – пероксидне число олії, ммоль $\frac{1}{2}$ О/кг;

V – об'єм розчину тіосульфату натрію, витрачений на титрування дослідної проби, мл;

V_0 – об'єм розчину тіосульфату натрію, витраченого на титрування контрольної проби, мл;

C – концентрація розчину тіосульфату натрію, моль/л;

n – маса дослідної проби, г;

$1\,000$ – коефіцієнт, що враховує перерахунок результату вимірювання в ммоль/кг.

У деяких міжнародних стандартах пероксидне число виражають у мілімолях активного кисню на кілограм, тоді одержане за цією методикою числове значення пероксидного числа зменшується вдвічі.

Обчислення проводять із точністю до другого десяткового знака з подальшим округленням до першого десяткового знака. Відносне розходження, допустиме між результатами двох паралельних визначень, складає 5 % за значень пероксидного числа від $3,0 \frac{1}{2}$ О ммоль/кг і більше та 10 % за значень менше $3,0 \frac{1}{2}$ О ммоль/кг.

Для того, щоб виразити пероксидне число в мілімолях активного кисню на кілограм жиру, мікрограмах активного кисню на грам жиру або у відсотках йоду, необхідно помножити результат, одержаний згідно з цією методикою, на коефіцієнти перерахування, які наведено у табл. 2:

Таблиця 2. Коефіцієнти перерахунку пероксидного числа

Спосіб вираження	Коефіцієнт перерахунку
мекв/кг	1
ммоль/кг	0,5
мкг/г	8
г йоду/100 г	1/78

Обладнання

1) терези лабораторні 2-го та 3-го класу точності; 2) конічні колби об'ємом 250 мл з притертими скляними пробками; 3) мірчі циліндри об'ємом 25 та 100 мл; 4) піпетки; 5) бюретки; 6) секундомір.

Реактиви

1) вода дистильована; 2) оцтова кислота (CH_3COOH) концентрована; 3) хлороформ; 4) йодид калію (KI) 50–55 % розчин; 5) крохмаль 0,5 % розчин; 6) тіосульфат натрію ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 0,01 N або 0,002 N розчин.

Приготування реактивів

Реактив № 4. Розчин йодиду калію (KI) готують, розчиняючи 500–550 г солі у дистильованій воді. Масу розчину доводять водою до 1 000 г. Зберігають розчин у темній посудині. Перед застосуванням перевіряють придатність розчину, додаючи дві краплі розчину крохмалю до 0,5 мл розчину йодиду калію в 30 мл суміші оцтової кислоти і хлороформу у співвідношенні 3 : 2. Якщо для знебарвлення блакитного забарвлення, що з'явилося, витрачають більше однієї краплі 0,01 моль/л розчину тіосульфату натрію – розчин йодистого калію не придатний і необхідно приготувати свіжий.

Реактив № 5. Для приготування розчину крохмалю змішують 5 г розчинного крохмалю з 30 мл холодної дистильованої води та за умови перемішування вливають цю суміш у 1 000 мл киплячої води і кип'ятять протягом 3 хв.

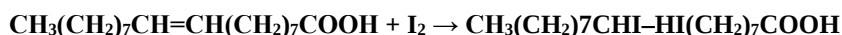
Реактив № 6. Розчин тіосульфату натрію ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) з концентрацією 0,1 N готують (запасний розчин) зі стандарт-титрів (фіксаналів). Розчин придатний до застосування через 10–14 діб. Розчин зберігають у склянці з темного скла. Термін зберігання отриманого зі стандарт-титрів розчину без додаткового контролю концентрації – 1 місяць. Після закінчення терміну зберігання необхідно визначити поправку до номінальної концентрації розчину. Для отримання розчину тіосульфату натрію необхідних концентрацій (0,002 або 0,01 N) запасний розчин тіосульфату натрію розбавляють відповідно в 50 та 10 разів безпосередньо перед використанням.

ПИТАННЯ ДЛЯ ПЕРЕВІРКИ ЗНАНЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Що таке пероксидне число жиру? Одиниці виміру.
2. Охарактеризуйте принцип методу визначення пероксидного числа олій.
3. Який порядок виконання аналізу з визначення пероксидного числа олій?
4. Які реактиви використовують для визначення пероксидного числа і яку функцію виконує кожен реактив?

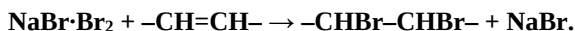
РОБОТА 7.9. ВИЗНАЧЕННЯ ЙОДНОГО ЧИСЛА МЕТОДОМ КАУФМАНА

Принцип методу. Йодне число – кількість грамів йоду, еквівалентна кількості галогену, що приєднався за місцем подвійних зв'язків до 100 г досліджуваної олії, жиру або жирних кислот. Йодне число виражають у відсотках йоду. Під час взаємодії галогенів із ненасиченими жирними кислотами до кожного подвійного зв'язку приєднується одна молекула галогену:



Для насичення подвійних зв'язків використовують нестійку сполуку $\text{NaBr} \cdot \text{Br}_2$, яка утворюється в розчині бромиду натрію в метиловому спирті (роз-

чин Кауфмана). У присутності ненасичених жирних кислот бром відщеплюється зі сполуки $\text{NaBr} \cdot \text{Br}_2$ і приєднується до подвійних зв'язків жирних кислот:



Перебіг аналізу. На аналітичних терезах зважують наважку досліджуваної олії, приміщеної у колбу, масу якої визначають згідно з табл. 3.

Таблиця 3. Маса дослідної проби, яка залежить від передбачуваного значення йодного числа

Передбачуване значення йодного числа, г $\text{I}_2/100$ г	Маса дослідної проби
від 5 до 20 включно	1,00
20...50	0,60
50...100	0,30
100...150	0,20
150...200	0,15
понад 200	0,10

У колби додають 10 мл хлороформу і обережно розмішують до повного розчинення. Після цього доливають із бюретки точно 20 мл розчину Кауфмана, розмішують, закривають колбу пробкою і залишають у темному місці за температури 20 °С для настоювання. Час настоювання встановлюють залежно від передбачуваної величини йодного числа:

- для олій та жирів з йодним числом менше ніж 100 – 1 година;
- для олій та жирів з йодним числом більше ніж 100 – 1,5 години.

Одночасно в аналогічних умовах готують контрольний дослід без наважки жиру.

Перед титруванням у колби доливають по 10–15 мл 10 % розчину йодиду калію і 50–60 мл дистильованої води, розмішують і титрують йод, що виділився, 0,1 N розчином тіосульфату натрію до світло жовтого забарвлення. Після цього додають 5–6 крапель розчину крохмалю і продовжують титрування до повного зникнення синього забарвлення. Йодне число розраховують за формулою:

$$A = \frac{0,01269 \times (a - b) \times K}{n} \times 100,$$

де:

A – йодне число, г $\text{I}_2/100$ г;

a – об'єм розчину $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, витраченого на титрування контрольного зразка, мл;

b – об'єм розчину $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, витраченого на титрування дослідного зразка, мл;

0,01269 – титр розчину тіосульфату натрію;

K – поправка до титру розчину тіосульфату натрію;

n – маса наважки жиру, г;

100 – коефіцієнт для перерахунку у %.

Розраховують середнє значення і похибку вимірювань. Розбіжність між паралельними визначеннями не повинна бути більшою за 1 % значення йодного числа.

Обладнання

1) колби об'ємом 250 мл; 2) бюретка; 3) аналітичні терези; 4) скляні палички; 5) термометр з інтервалом вимірювань від 0 до 100 °С.

Реактиви

1) хлороформ; 2) розчин Кауфмана; 3) йодид калію (KI) 10 % розчин; 4) тіосульфат натрію ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 0,1 N розчин; 5) крохмаль 1 % розчин; 6) дистильована вода.

Приготування реактивів

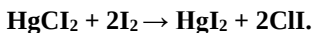
Реактив № 2 (розчин Кауфмана). 140 г броміду натрію (висушеного за температури 130 °С) розчиняють в 1 л метанолу. Розчин добре розмішують і залишають на 24 год, після чого додають 5,1 мл бром, витримують від 10 до 15 хв.

ПИТАННЯ ДЛЯ ПЕРЕВІРКИ ЗНАТЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Що характеризує значення йодного числа жиру (жирних кислот)?
2. Наведіть визначення методу визначення йодного числа жиру.
3. Охарактеризуйте перебіг аналізу. У яких одиницях вимірюється йодне число жиру?
4. Від чого залежить значення йодного числа жиру?

РОБОТА 7.10. ВИЗНАЧЕННЯ ЙОДНОГО ЧИСЛА МЕТОДОМ ГЮБЛЯ

Принцип методу. Метод базується на використанні для насичення подвійних зв'язків хлориду йоду (CII, розчин Гюбля), який утворюється внаслідок взаємодії спиртових розчинів сулеми (HgCl_2) і йоду за реакцією:



Хлорид йод приєднується до подвійних зв'язків кількісно, насичуючи їх.



Перебіг аналізу. На аналітичних терезах у дві колби зважують від 0,1 до 0,2 г олії, додають 10–15 мл хлороформу і обережно розмішують до повного розчинення. Далі наливають із бюретки точно 25 мл розчину Гюбля, розмішують, закривають колбу притертою пробкою, змоченою розчином йодиду калію, і залишають для насичення подвійних зв'язків у темному місці за температури 20 °С протягом 18–20 год. Одночасно готують контрольний дослід. Для цього у колбу наливають таку саму кількість хлороформу, 25 мл розчину Гюбля і залишають у темноті протягом такого самого часу.

Після цього у колби додають по 20 мл розчину KI і 50–60 мл дистильованої води, струшують. Йод, що виділився, титрують, розмішуючи, розчином тіосуль-

фату натрію концентрацією 0,1 N до блідо-жовтого забарвлення. Після цього додають від 1 до 2 мл розчину крохмалю і продовжують титрувати до повного зникнення синього забарвлення. Йодне число розраховують за формулою:

$$A = \frac{0,01269 \times (a - b) \times K}{n} \times 100,$$

де:

A – йодне число, г I₂/100 г;

a – об'єм розчину Na₂S₂O₃, витраченого на титрування контрольного зразка, мл;

b – об'єм розчину Na₂S₂O₃, витраченого на титрування дослідного зразка, мл;

0,01269 – титр розчину тіосульфату натрію;

K – поправка до титру розчину тіосульфату натрію;

n – маса наважки жиру, г;

100 – коефіцієнт для перерахунку у %.

Розраховують середнє значення та похибку вимірювання. Розходження між двома паралельними визначеннями не повинно перевищувати 1 % значення йодного числа.

Обладнання

1) аналітичні терези; 2) скляні палички; 3) бюретка; 4) колби об'ємом 250 мл зі шліфами; 5) термометр з інтервалом вимірювань від 0 до 100 °С.

Реактиви

1) хлороформ; 2) розчин Гюбля; 3) йодид калію (KI) 10 % розчин; 4) тіосульфату натрію (Na₂S₂O₃) 0,1 N розчин; 5) крохмаль 1 % розчин; 6) дистильована вода.

Приготування реактивів

Реактив № 2. Розчин Гюбля готують за дві доби до використання. 30 г сулеми (HgCl₂) розчиняють у 500 мл етанолу. 25 г йоду розчиняють у 500 мл етанолу. Отриманий розчин додають до розчину сулеми і змішують.

ПИТАННЯ ДЛЯ ПЕРЕВІРКИ ЗНАНЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Що характеризує значення йодного числа жиру (жирних кислот)?
2. Дайте характеристику принципу методу визначення йодного числа за Гюблем.
3. Наведіть методику визначення йодного числа жиру. У яких одиницях вимірюється йодне число жиру?
4. Від чого залежить значення йодного числа жиру?
5. Як обчислюються результати аналізу? Яка похибка визначення допускається?

РОБОТА 7.11. ВИЗНАЧЕННЯ ЙОДНОГО ЧИСЛА ЖИРУ МЕТОДОМ ВІЙСА

Принцип методу. Пробу розчиняють у розчиннику і додають розчин Війса. Через певний час додають йодид калію та воду. Йод, що виділився, титрують розчином тіосульфату натрію.

Перебіг аналізу. У колбі з пришліфованою пробкою зважують на аналітичних терезах пробу олії із записом результату до четвертого десяткового знака. Масу проби жиру визначають згідно з табл. 3 залежно від передбачуваного значення йодного числа. Наважку розчиняють у 10 мл чотиріхлориду вуглецю і додають із бюретки точно 25 мл розчину Війса. Закривають колбу пришліфованою пробкою, змоченою розчином йодистого калію (необхідно стежити, щоб сліди розчину йодистого калію не потрапили в реакційну суміш). Перемішують вміст колби обережними обертами і примішують у темне місце за температури 18–20 °С для настоювання. Час настоювання встановлюють залежно від передбачуваної величини йодного числа:

- для олій та жирів з йодним числом менше ніж 150 – 1 год;
- для олій та жирів з йодним числом вище ніж 150 – 2 год.

Після закінчення зазначеного терміну доливають 15 мл розчину йодиду калію і 100 мл дистильованої води. Струшують колбу і титрують вміст 0,1 N розчином тіосульфату натрію до одержання солом'яно-жовтого забарвлення. Після цього додають від 1 до 2 мл розчину крохмалю і титрують до повного зникнення синього забарвлення.

Одночасно в тих самих умовах проводять контрольне дослідження (без наважки жиру). Йодне число розраховують за формулою:

$$A = \frac{0,01269 \times (a - b) \times K}{n} \times 100,$$

де:

A – йодне число, г I₂/100 г;

a – об'єм розчину Na₂S₂O₃, витраченого на титрування контрольного зразка, мл;

b – об'єм розчину Na₂S₂O₃, витраченого на титрування дослідного зразка, мл;

0,01269 – титр розчину тіосульфату натрію;

K – поправка до титру розчину тіосульфату натрію;

n – маса наважки жиру, г;

100 – коефіцієнт для перерахунку у %.

Обладнання

1) аналітичні терези; 2) скляні палички; 3) бюретка; 4) колби об'ємом 250 мл зі шліфами; 5) термометр з інтервалом вимірювань від 0 до 100 °С.

Реактиви

1) оцтова кислота (CH_3COOH) концентрована; 2) йодид калію (KI) 10 % розчин; 3) чотирхлорид вуглецю ч. д. а.; 4) розчин Війса; 5) тіосульфат натрію ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 0,1 N розчин; 6) крохмаль 1 % розчин.

Приготування реактивів

Реактив № 4 (розчин Війса). 9 г трихлориду йоду розчиняють в 1 л суміші, що складається з 700 мл оцтової кислоти і 300 мл чотирхлориду вуглецю. Після повного розчинення визначають вміст галогену так: піпеткою відбирають 5 мл приготованого розчину в колбу, додають 5 мл розчину йодиду калію і 30 мл води. Одержану суміш титрують розчином тіосульфату натрію у присутності індикатору крохмалю. Після визначення масової концентрації галогену до розчину додають 10 г йоду. Знову визначають вміст галогену, як описано вище. Масова концентрація галогену у г/мл після додавання йоду повинна зрости у 1,5 раза, порівняно із першим визначенням. Якщо підвищення масової концентрації менше від вказаної величини, додають невеликі кількості йоду доти, доки вміст його не підвищиться у 1,5 раза від початкового.

Дають розчину відстоятися до прозорості, далі декантують у пляшку з темного скла з пришліфованою пробкою.

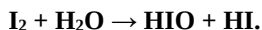
За відсутності трихлориду йоду розчин Війса можна приготувати в інший спосіб. Розчиняють 16 г йоду у 1 200 мл оцтової кислоти. Відміряють бюреткою точно 5 мл приготованого розчину в конічну колбу, додають туди 5 мл розчину йодистого калію, 30 мл дистильованої води і титрують пробу розчином тіосульфату натрію у присутності індикатору крохмалю. Установлюють у такий спосіб вміст галогену в розчині. Далі відміряють 1 л розчину і пропускають крізь нього очищений хлор доти, доки масова концентрація розчину не збільшиться удвічі. За таких умов забарвлення розчину змінюється з темно-бурого на червоно-жовте. Надлишок йоду повинен становити приблизно 2 %. Розчин Війса необхідно зберігати у темному місці у пляшці з коричневого скла з пришліфованою пробкою.

ПИТАННЯ ДЛЯ ПЕРЕВІРКИ ЗНАНЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

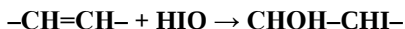
1. Що характеризує значення йодного числа жиру (жирних кислот)?
2. Наведіть методику визначення йодного числа жиру за Війсом.
3. Від чого залежить значення йодного числа жиру?
4. У чому полягає принцип методу вимірювання йодного числа за Війсом?

РОБОТА 7.12. ВИЗНАЧЕННЯ ЙОДНОГО ЧИСЛА ЖИРУ ПРИСКОРЕНИМ МЕТОДОМ (МЕТОДОМ МАРГОШЕСА)

Принцип методу. Метод базується на застосуванні гіпойодитної кислоти, яка утворюється внаслідок взаємодії йоду з водою за реакцією:



Ця реакція у спиртових розчинах практично не відбувається, але прискорюється наявністю ненасичених зв'язків жирів, особливо за додавання надлишку води. Гіпойодитна кислота реагує з етиленовими зв'язками значно швидше, ніж галогени:



Перебіг аналізу. У дві сухі колбу зважують від 0,1 до 0,15 г рослинної олії, додають 10 мл етанолу, приєднують зворотний холодильник і нагрівають протягом 15–20 хв на водяній бані з температурою 50–60 °С. Після цього колбу охолоджують. В охолоджену колбу додають точно 25 мл спиртового розчину йоду, 200 мл дистильованої води і секундоміром вимірюють час. Через 5 хв суміш титрують якомога швидше розчином тіосульфату натрію. Спочатку тіосульфат додають до одержання світло-жовтого кольору, а далі, додавши кілька крапель крохмалю, суміш титрують до знебарвлення. За аналогічних умов готують контрольний дослід без наважки жиру. Йодне число розраховують за формулою:

$$A = \frac{0,01269 \times (a - b) \times K}{n} \times 100,$$

де:

A – йодне число, г I₂/100 г;

a – об'єм розчину Na₂S₂O₃, витраченого на титрування контрольного зразка, мл;

b – об'єм розчину Na₂S₂O₃, витраченого на титрування дослідного зразка, мл;

0,01269 – титр розчину тіосульфату натрію;

K – поправка до титру розчину тіосульфату натрію;

n – маса наважки жиру, г;

100 – коефіцієнт для перерахунку у %.

Розраховують середнє значення та похибку вимірювань. Розбіжності між паралельними визначеннями не повинні бути більшими ніж 1,5 % від значення йодного числа.

Обладнання

1) колби об'ємом 500 мл зі шліфами; 2) зворотний холодильник; 3) водяна баня; 4) секундомір.

Реактиви

1) етанол 96 %; 2) йод (I₂) 2,5 % спиртовий розчин (розчин Маргошеса); 3) тіосульфат натрію (Na₂S₂O₃) 0,1 N розчин; 4) крохмаль 1 % розчин; 5) дистильована вода.

ПИТАННЯ ДЛЯ ПЕРЕВІРКИ ЗНАНЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Що характеризує значення йодного числа жиру (жирних кислот)?

2. Наведіть методику визначення йодного числа жиру за Маргошесом.
3. Від чого залежить значення йодного числа жиру?
4. У чому полягає принцип методу вимірювання йодного числа за Маргошесом?

РОБОТА 7.13. РЕФРАКТОМЕТРИЧНИЙ МЕТОД ВИЗНАЧЕННЯ ЙОДНОГО ЧИСЛА

Принцип методу. Цей метод дає змогу визначити йодне число за показником заломлення олії. Необхідною умовою для отримання відтворюваності результатів та їх кореляції з даними, отриманими за допомогою хімічних методів, є суворе дотримання температури під час заміру показника заломлення.

Перебіг аналізу. Визначення показника заломлення здійснюють на рефрактометрі. Для цього краплину олії наносять на призму приладу та вимірюють показник заломлення згідно з інструкцією використання приладу. Величину йодного числа (у г на 100 г жиру) обчислюють за формулою, у яку підставляють середню величину показника заломлення (n_D^{20}), отриману для двох паралельних проб:

$$A = \frac{(n_D^{20} - 1,4595) \times 100}{0,0118},$$

де:

A – йодне число, г/100 г;

n_D^{20} – показник заломлення.

ПИТАННЯ ДЛЯ ПЕРЕВІРКИ ЗНАЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Що характеризує значення йодного числа жиру (жирних кислот)?
2. Наведіть методику визначення йодного числа жиру рефрактометричним методом.
3. Від чого залежить значення йодного числа жиру?
4. В чому полягає принцип методу вимірювання йодного числа рефрактометричним методом?
5. Наведіть методику роботи з рефрактометром.

РОБОТА 7.14. ВИЗНАЧЕННЯ ЧИСЛА ОМИЛЕННЯ

Принцип методу. Числом омилення називають кількість міліграмів КОН, яка необхідна для омилення тригліцеридів і нейтралізації жирних кислот (у тому числі і вільних), які знаходяться в 1 г жиру. Число омилення є характерним показником, значення якого для одного і того ж сорту олії або жиру коливаються в досить вузькому інтервалі. Визначення числа омилення базується на обробці

жирів або олії деякою кількістю 0,5 N розчину лугу до повного омилення гліцеридів та жирних кислот; надлишок лугу відфільтровують кислотою. Під час омилення рекомендують використовувати спиртові розчини лугу. Для повного омилення тригліцеридів необхідно використовувати 100 % надлишок лугу. Час омилення – не менше 1 години.

Перебіг аналізу. На аналітичних терезах зважують 1–1,5 г олії або жиру і вносять його в колбу. Далі із бюретки в колбу доливають 25 мл 0,5 N спиртового розчину КОН, прикріплюють повітряний холодильник і нагрівають на водяній бані протягом 1 год, слідкуючи за тим, щоб пари спирту не виходили з верхньої частини холодильника. Після омилення в колбі повинен бути однорідний прозорий розчин. Одночасно в іншій колбі за тих самих умов кип'ятять 0,5 N спиртовий розчин КОН у кількості, рівній взятій для омилення (контрольна проба). Після кип'ятіння обидві проби титрують у гарячому стані 0,5 N розчином соляної кислоти у присутності фенолфталеїну або тимолфталеїну. Визначення числа омилення проводять за формулою:



Рис. 26. Колба і повітряний холодильник

$$A = \frac{(a - b) \times 28,05 \times K}{n},$$

де:

A – число омилення, мг КОН/г;

a – кількість 0,5 N розчину соляної кислоти, яка витрачена на титрування контрольної проби, мл;

b – кількість тієї самої кислоти, яка витрачена на титрування реакційної маси після омилення, мл;

n – маса взятої олії, г;

28,05 – титр 0,5 N розчину соляної кислоти за КОН, мг/мл;

K – поправка на титр.

Обладнання

1) аналітичні терези; 2) колба об'ємом 250 мл з повітряним холодильником.

Реактиви

1) гідроксид калію (КОН) 0,5 N розчин у етанолі; 2) соляна кислота (HCl) 0,5 N розчин у воді; 3) фенолфталеїн або тимолфталеїн 1 % розчин у етанолі.

РОБОТА 7.15. ВИЗНАЧЕННЯ ЧИСЛА ОМИЛЕННЯ

Існують також інші методики визначення числа омилення жирів. Зокрема, залежно від наявності та кількості рослинних олій можна використовувати наступні методики.

Модифікація 1

Перебіг аналізу. У колбу вміщують 0,5 г твердого жиру або 0,5 мл олії (досліджувана проба), у другу пробірку наливають 0,5 мл води (контрольна проба). В обидві колби доливають по 15 мл спиртового розчину КОН і кип'ятять зі зворотним холодильником на водяній бані протягом 50 хв до повного омилення гліцеридів і нейтралізації вільних жирних кислот. Отриманий розчин охолоджують до 30–40 °С. В обидві колби додають по декілька крапель розчину фенолфталеїну і титрують теплим 0,5 N розчином НСІ до зникнення рожевого забарвлення (до нейтральної реакції).

Кількість міліграмів КОН, витрачену на нейтралізацію всіх жирних кислот, що містяться в 1 г жиру (число омилення) визначають за формулою:

$$A = \frac{(a - b) \times 28,05 \times K}{n},$$

де:

A – число омилення, мг КОН/г;

a – кількість 0,5 N розчину соляної кислоти, яка витрачена на титрування контрольної проби, мл;

b – кількість тієї самої кислоти, яка витрачена на титрування реакційної маси після омилення, мл;

n – маса взятої олії, г;

28,05 – титр 0,5 N розчину соляної кислоти за КОН, мг/мл;

K – поправка на титр.

Модифікація 2

Найчастіше використовується для аналізу рослинних олій (соняшникова олія).

Перебіг аналізу. У колбу з досліджуваною пробом приміщують 2 г олії, у колбу з контрольною пробом – 0,5 мл води. В обидві колби додають по 30 мл 0,5 M спиртового розчину КОН і кип'ятять зі зворотним холодильником на водяній бані протягом 60 хв до повного омилення гліцеридів та нейтралізації вільних жирних кислот; під час кип'ятіння періодично перемішують вміст колб. Після цього в обидві колби додають по 10 крапель розчину фенолфталеїну і титрують ще теплі розчини, 0,5 M розчином НСІ до зникнення рожевого забарвлення (нейтральна реакція).

Кількість КОН (число омилення), що витрачена на нейтралізацію вільних жирних кислот в 1 г жиру, визначається за формулою:

$$A = \frac{(a - b) \times 28,05 \times K}{n},$$

де:

A – число омилення, мг КОН/г;

a – кількість 0,5 N розчину соляної кислоти, яка витрачена на титрування контрольної проби, мл;

b – кількість тієї самої кислоти, яка витрачена на титрування реакційної маси після омилення, мл;

n – маса взятої олії, г;

28,05 – титр 0,5 N розчину соляної кислоти за КОН, мг/мл;

K – поправка на титр.

Обладнання

1) колби об'ємом 100–150 мл; 2) зворотний холодильник; 3) водяна баня; 4) піпетки; 5) бюретки.

Реактиви

1) соняшникова або інша рослинна олія; 2) фенолфталеїн 0,1 % розчин у етанолі; 3) соляна кислота (HCl) 0,5 M розчин; 4) гідроксид калію (KOH) 0,5 M розчин у етанолі.

Приготування реактивів

Реактив № 4 (спиртовий розчин КОН 0,5 M). 30 г КОН розчиняють у 50–60 мл H₂O, доливають 95 % етанол до 1 л, залишають на добу. Прозорий розчин зливають і зберігають у посуді з темного скла.

ПИТАННЯ ДЛЯ ПЕРЕВІРКИ ЗНАТЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ (до робіт 7.14 та 7.15)

1. Поняття «числа омилення».
2. Яка різниця між кислотним числом і числом омилення? Як пов'язані між собою ці два показники?
3. Як показник числа омилення впливає на якість олії?
4. Для чого проводять контрольну пробу в методиці визначення числа омилення?

РОБОТА 7.16. МЕТОДИКА ВИЗНАЧЕННЯ НЕНАСИЧЕНОСТІ ОЛІЙ ЗА ПОСЕРЕДНИЦТВОМ ПЕРОКСИДЕКАНОВОЇ КИСЛОТИ

Принцип методу. Наявні методи аналізу ненасичених сполук ґрунтуються на використанні реакційної здатності подвійного зв'язку. Як відомо, у найбільш поширених методах використовують здатність подвійних зв'язків приєднувати атоми чи групи атомів. У практиці аналізу з цією метою застосовують галогени (йод, бром) для визначення так званих бромних і йодних чисел. Однак приєднання галогенів до подвійного зв'язку часто супроводжується небажаними побічними процесами (наприклад, реакції заміщення), що призводять до перевищення галогенів, а відтак – до спотворення результатів аналізу. Починаючи з 1909 р.,

коли М. Прилежаєв показав, що надбензойна кислота (НБК) кількісно окислює ненасичені сполуки, у науковій літературі з'явилась низка праць, автори яких намагались використати цю кислоту з аналітичною метою, зокрема для визначення так званих кисневих чисел – кількісного показника результатів аналізу ненасичених сполук. Можливість використання реакції епоксидування для аналітичних цілей оснований, з одного боку, на існуванні простих методів визначення кількості наявної в реакційній суміші пероксикислоти, а з іншого – на кількісному перебігу цього процесу.

Перебіг аналізу. Приблизно 0,1 г олії (точна наважка) розчиняють у конічній колбі об'ємом 75 мл з притертим корком у 25,0 мл хлороформу або дихлорметану (чи в іншому органічному розчиннику), вносять приблизно 0,2 г (точна наважка) цис-епокси-пероксидеканової кислоти, закорковують колбу, ретельно збовтують і починають відлік часу (вмикають хронометр).

У конічну колбу за допомогою піпетки відбирають 1 мл отриманого розчину, додають за інтенсивного збовтування 4 мл розбавленої ацетатної кислоти і 1 мл 10 % розчину йодиду калію, а вивільнений йод одразу титрують стандартним 0,1 М розчином тіосульфату натрію. Далі реакційну суміш залишають на 2,3–2,5 год, після чого повторюють визначення, як описано вище.

Кисневе число (число грамів оксигену, поглинутого 100 г проби, або % поглинутого кисню) з урахування пероксидного числа розраховують за формулою:

$$KЧ = \frac{(V_1 - V_2 - V_0) \times 25 \times 0,1 \times 8 \times 100}{a \times 1\,000} \times K,$$

де:

КЧ – кисневе число;

V₁ – об'єм розчину натрій тіосульфату, витрачений на титрування у контрольному досліді (на вміст пероксикислоти – без проби сполуки, що визначається), мл;

V₂ – об'єм розчину натрій тіосульфату, витрачений на титрування залишку пероксикислоти у досліді з пробю ненасиченої аналізованої сполуки, мл;

V₀ – об'єм розчину натрій тіосульфату, витрачений на титрування у досліді з пробю сполуки, що визначається (без пероксикислоти на пероксида), мл;

0,1 – молярна концентрація розчину тіосульфату;

a – наважка проби, г;

1 000 – перерахунок у г;

8 – молярна маса еквівалента кисню, г/моль ($f = \frac{1}{2}$);

K – коефіцієнт поправки концентрації розчину натрій тіосульфату до 0,1000 моль/л;

100 – перерахунок на 100 г жиру, масла або олії.

Обладнання

1) аналітичні терези; 2) конічні колби з притертою пробкою об'ємом 75 мл; 3) конічні колби для титрування; 4) мірчі піпетки об'ємом 1 та 5 мл; 5) бюретки.

Реактиви

1) хлороформ або інший органічний розчинник; 2) цис-епокси-пероксиде-канова кислота; 3) оцтова кислота (CH_3COOH) розбавлена 1 : 1; 4) йодид калію (KI) 10 % розчин; 5) тіосульфат натрію ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 0,1 М розчин.

Приготування реактивів

Реактив № 2 (цис-9,10-епокси-октадеканова кислота). До 25 мл 1 % розчину (0,0009 М) пероксидеканової кислоти у дихлорметані повільно додають 0,185 г (0,00006 М) олеїнової кислоти за 25° С, витримують 1 год. Реакційну суміш промивають у ділильній лійці 15 % розчином карбонату натрію і водою до нейтральної реакції. Отриманий розчин у органічному розчиннику сушать від залишків води витримуванням над безводним сульфатом натрію.

ПИТАННЯ ДЛЯ ПЕРЕВІРКИ ЗНАНЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Поняття пероксидне число жиру. Одиниці виміру.
2. Принцип методу визначення пероксидного числа жиру.
3. Методика визначення пероксидного числа.
4. Які реактиви використовують для визначення пероксидного числа і яку функцію виконує кожен реактив?

8. АНАЛІЗ БІЛКІВ ТА АМІНОКИСЛОТ У РОСЛИН

РОБОТА 8.1. ЯКІСНІ РЕАКЦІЇ НА БІЛОК

Приготування розчину білка для проведення якісних реакцій

25 г пшеничного борошна змішують зі 100 мл дистильованої води і збовтують суміш протягом 1 год з допомогою апарата для збовтування. Суміш борошна центрифугують і надосадову рідину фільтрують через паперовий фільтр. Прозорий розчин містить переважно альбумін пшеничних зерен.

Біуретова реакція

Біуретова реакція (рис. 27) дає змогу виявити наявність пептидних зв'язків у молекулах білка. У пробірку наливають 1–2 мл розведеного білкового розчину,

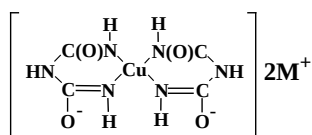


Рис. 27. Біуретова реакція

додають подвійний об'єм 30 % розчину гідроксиду натрію, ретельно перемішують і додають 2–3 краплі 1 % розчину сульфату міді. Знову ретельно перемішують. Розвивається червоно-фіолетове забарвлення. За невеликого вмісту білка чутливість реакції можна підвищити, нашаровуючи

на розчин білка та лугу 1 мл 1 % розчин сульфату міді. Під час відстоювання на границі двох шарів з'являється фіолетове кільце.

Нінгідринова реакція

У пробірку наливають 2–3 мл розведеного розчину білка, додають 3–4 краплі 1 % розчину нінгідрину у 95 % ацетоні. Вміст пробірок перемішують. Пробірки ставлять у водяну баню за температури 70 °C на 3–5 хв.

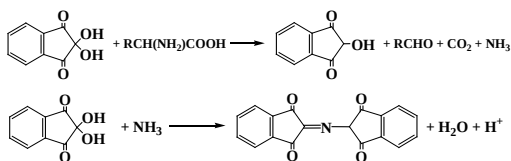


Рис. 28. Нінгідринова реакція

Розвивається синьо-фіолетове забарвлення, яке свідчить про наявність у білку радикалів амінокислот. Реакція проходить за схемою, наведеною на рис. 28.

Ксантопротеїнова реакція

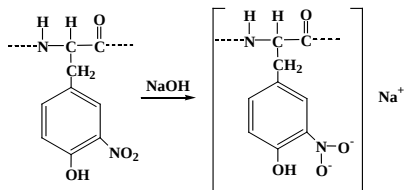


Рис. 29. Ксантопротеїнова реакція

Ксантопротеїнова реакція (рис. 29) відбувається тільки за наявності у білках залишків ароматичних амінокислот – фенілаланіну, тирозину та триптофану.

У пробірці наливають по 1 мл розчину білка. До нього додають 5–6 крапель концентрованої азотної кислоти до появи білого осаду або каламуті від білка, який згортається. Під час нагрівання

розчин та осад білка забарвлюються у жовтий колір. Осад майже повністю розчиняється.

Суміш охолоджують та обережно додають до розчину, який має кислу реакцію, не мішаючи, краплями, надлишок гідроксиду амонію або натрію до лужної реакції. Осад кислотного альбуміну, який випадає на початку, розчиняється, і рідина забарвлюється в оранжевий колір. Зміна жовтого забарвлення на оранжеве в лужному середовищі обумовлена появою хромофорної групи.

Реакція Паулі

До 1 мл 1 % розчину сульфанілової кислоти у 5 % розчині соляної кислоти додають 2 мл 0,5 % розчину нітриту натрію, сильно струшують і відразу додають 2 мл розведеного розчину білка, знову перемішують та додають 6 мл 10 % розчину карбонату натрію. Після перемішування розчинів розвивається вишнево-червоне забарвлення, яке обумовлене наявністю у білковій молекулі залишків гістидину та тирозину (рис. 30).

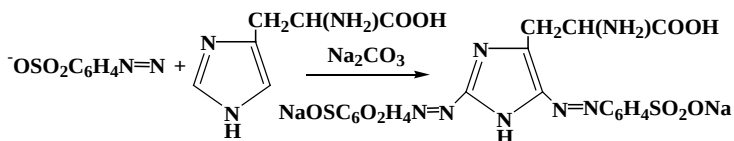


Рис. 30. Реакція Паулі

Нітропрусидна реакція

У пробірку наливають 3 мл розведеного розчину білка, додають рівний об'єм насиченого розчину сульфату амонію, 2–3 краплі 5 % розчину нітропрусиду натрію та декілька крапель концентрованого аміаку для створення лужного середовища. Якщо в білку присутній цистеїн, то відбувається реакція, внаслідок якої утворюється пурпурове забарвлення.

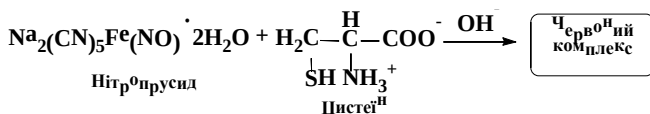


Рис. 31. Нітропрусидна реакція

Реакція з пікриновою кислотою

До 2 мл розведеного розчину білка додають 0,5 г карбонату натрію, додають 1 мл насиченого водяного розчину пікринової кислоти, перемішують і нагрівають у полум'ї горілки кілька хвилин. Жовте забарвлення розчину поступово переходить у червоне внаслідок відновлення пікринової кислоти в пікramінову. Припускають, що відновлення пікринової кислоти в пікramінову здійснюється завдяки дикетопіперазиновим угрупованням, які можуть виникнути вна-

слідок конденсації відновлюваних амінокислот із білкової молекули під час кип'ятіння в лужному середовищі, а також завдяки HS-групам білків.

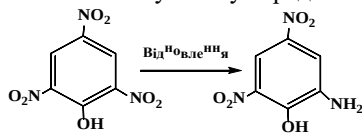


Рис. 32. Схема відновлення пікринової кислоти

Водночас відновлення пікринової кислоти можливе аміноцукрами, моносахаридами та іншими сполуками, що входять до складу деяких білків як нормальні інгредієнти. Тому ця кольорова реакція на білок малоспецифічна.

Реакція Сакагучі

Беруть у пробірку 2–3 мл розведеного розчину білка, додають 1 мл 10 % розчину гідроксиду натрію, і одразу після цього декілька крапель 0,2 % розчину α -нафтолу у етанолі. Перемішують, доливають 0,5 мл розчину гіпоброміту натрію і знову перемішують. Розвивається оранжево-червоне забарвлення, поява якого пояснюється взаємодією α -нафтолу у присутності окисника з гуанідиновими групами радикалів аргініну, наявними у молекулі білка.

Реакція Міллона

Реакція запропонована Е. Міллоном у 1849 р. До 0,5–1 мл нерозбавленого білка додають подвійний об'єм азотно-ртутного реактиву Міллона. Білок зсідається під дією солей ртуті та азотної кислоти, що входять у реактив, утворюючи згусток білого кольору. Після нагрівання пробірки в полум'ї пальника осад забарвлюється в цегляно-червоний колір. Реакцію Міллона дають усі білки, що містять у своєму складі залишок тирозину. Білки, які не містять тирозину (наприклад, протаміни), реакції Міллона не дають.

Реакція Адамкевича

Наливають у пробірку кілька крапель нерозбавленого білка та додають 2 мл крижаної оцтової кислоти, до якої додають небагато гліоксилової кислоти. Суміш злегка нагрівають до розчинення утвореного осаду. Охолоджують пробірку із сумішшю, сильно нахилиють її і обережно, по стінці доливають 1 мл концентрованої сірчаної кислоти так, щоб обидві рідини не змішалися. Під час відстоювання на границі двох рідин виникає червоно-фіолетове кільце. Забарвлення виникає за рахунок реакції триптофану із гліоксиловою кислотою, що завжди присутня у оцтовій кислоті у вигляді домішки.

Реакція Вуазене

До 2 мл розведеного розчину білка у пробірці додають одну краплю 2,5 % розчину формальдегіду. Змішують і додають 6 мл чистої концентрованої соляної кислоти (густина не менше 1,175), після чого знову перемішують. Через 10 хв додають зі збовтуванням 10 крапель 0,5 % розчину нітриту натрію. Розвивається інтенсивне синьо-фіолетове забарвлення. Реакція Вуазене також протікає тільки з тими білками, які містять у своєму складі триптофан.

Реакція Фоля

Білки, які містять сульфгідрильні групи (–SH), можна виявити за допомогою реакції Фоля. Під час проведення цієї реакції діють плюмбітом натрію (Na_2PbO_2), який утворюється внаслідок взаємодій ацетату свинцю ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$) та гідроксиду натрію (NaOH). У процесі реакції утворюється чорний нерозчинний осад сульфїду свинцю (рис. 33).

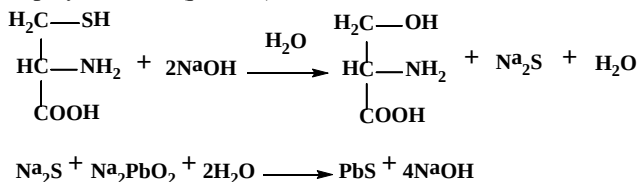


Рис. 33. Реакція Фоля

Метіонін, незважаючи на вміст сірки, цієї реакції не дає, оскільки сірка міцно зв'язана з метильною групою.

Для проведення реакції у пробірку додають 5 крапель розчину білка, 5 крапель 30 % розчину гідроксиду натрію та 1 краплю 5 % розчину ацетату свинцю. Вміст пробірки інтенсивно кип'ятять та дають відстоятися 1–2 хв. За цей час у пробірці утворюється осад сульфїду свинцю чорного кольору.

Обладнання

1) апарат для струшування; 2) паперові фільтри (синя стрічка); 3) пробірки; 4) конічні колби об'ємом 100 та 250 мл; 5) електрична плитка; 6) водяна баня; 7) центрифуга.

Реактиви

1) пшеничне борошно; 2) гідроксид натрію або калію (NaOH або KOH); 3) аміак (NH_3) розчин; 4) нітрит натрію (NaNO_2); 5) сульфат міді ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$); 6) ацетон; 7) сульфанілова кислота; 8) соляна кислота (HCl); 9) карбонат натрію (Na_2CO_3); 10) сульфат амонію (NH_4SO_4); 11) нітропрусид натрію; 12) нінгідрин; 13) азотна кислота (HNO_3); 14) гіпоброміт натрію; 15) реактив Міллона; 16) формальдегід (2,5 %); 17) крижана оцтова кислота; 18) гліоксилова кислота; 19) нітрит натрію (0,05 % та 0,5%); 20) сульфанілова кислота (1 %); 21) карбонат натрію (10 %); 22) ацетат свинцю ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$) 5 %.

Приготування реактивів

Реактив № 14 (гіпоброміт натрію). Для приготування розчину гіпоброміту натрію до 1–2 мл 30 % гідроксиду натрію додають під час охолодження 3–4 краплі бром та струшують суміш до розчинення бром і зникнення його забарвлення.

Реактив № 15 (реактив Міллона). Для приготування реактиву Міллона 40 г ртуті розчиняють під час нагрівання у 57 мл концентрованої азотної кислоти, розчин розбавляють двома об'ємами води і рідину зливають із відстояного осаду.

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАТЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Дайте характеристику будови молекули білка. Яке значення мають білки в життєдіяльності рослин?
2. Які якісні реакції використовуються для вияву білків у розчинах або витяжках із рослинних тканин?
3. Які групи білка визначаються за допомогою біуретової реакції? Умови її проведення.
4. На що вказує ксантопротеїнова реакція? Як вона проводиться?
5. Дайте характеристику нінгідринової реакції.
6. Яким методом можна виявити в білку наявність залишків гістидину, цистеїну та тирозину? Умови проведення цих реакцій.
7. Охарактеризуйте реакцію з пікриновою кислотою. На чому оснований її принцип?
8. Які реакції можна використати для виявлення тирозину у білку? Як вони проводяться?
9. Як проводиться реакція Сакагучі? Присутність яких груп у білках обумовлює цю реакцію?
10. Як виявити триптофан у білках? Наведіть умови проведення цих реакцій.
11. Які реакції на сірковмісні білки ви знаєте? Наведіть умови проведення реакції Фоля.
12. Охарактеризуйте специфічність наведених у роботі якісних реакцій на білки.

РОБОТА 8.2. ГРАНУЛОМЕТРИЧНИЙ МЕТОД ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ БІЛКА У РОСЛИННОМУ МАТЕРІАЛІ

Перебіг аналізу. Беруть 2–3 г подрібненої рослинної тканини, переносять у фарфорову ступку і розтирають із битим склом до однорідної маси. Додають декілька мілілітрів дистильованої води і продовжують розтирати матеріал до гомогенного стану. Розтертий рослинний матеріал переносять у центрифугальні пробірки, додають 5 мл 0,2 % NaOH. Пробірки залишають на 30 хв для екстракції білка. Осад у пробірках періодично мішають скляною паличкою. Центрифугують за 4 000–5 000 об./хв протягом 5 хв. Надосадову рідину зливають у чисту конічну колбу об'ємом 100 мл. До осаду у центрифугальних пробірках знову додають 5 мл 0,2 % розчину NaOH, перемішують скляною паличкою і залишають на 30 хв, а далі центрифугують. Для повного екстрагування білків цю операцію повторюють 5–6 разів. Після кожного центрифугування надосадову рідину об'єднують із тією, що міститься у колбі. Об'єм об'єднаного екстракту вимірюють циліндром і до цього розчину додають 50 % розчин трихлороцтової кислоти до

її кінцевої концентрації 5 %. Для повного осадження білків екстракт залишають до наступного дня. Далі осад білка центрифугують і розчиняють 0,5 % розчином NaOH. Після розчинення білків їх знову осаджують трихлороцтовою кислотою. Після повторного осадження білків рідину центрифугують за 4 000–5 000 об./хв протягом 5 хв. Надосадову рідину зливають, а осад промивають 10 мл етанолу, перемішують та центрифугують. Цю операцію повторюють двічі. Далі осад двічі промивають діетиловим ефіром за тих самих умов. Осад білка збирають у зважений з точністю до 0,1 мг скляний бюкс, висушують у вакуум-ексикаторі і зважують на аналітичних терезах. Обчислюють вміст білка у відсотках до сирової маси рослини.

Обладнання

1) ступка з товчачиком; 2) центрифугальні пробірки; 3) центрифуга; 4) скляні палички; 5) колби об'ємом 100 мл; 6) металеві бюкси; 7) аналітичні терези; 8) вакуум-ексикатор.

Реактиви

1) трихлороцтова кислота (CCl_3COOH) 50 % розчин; 2) гідроксид натрію (NaOH) 0,2 та 0,5 % розчини; 3) етанол; 4) діетиловий ефір.

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАЙТЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Чому як розчинник рослинних білків у роботі використовується розчин луку?
2. Навіщо проводять осадження білків трихлороцтовою кислотою?
3. Як позбутися речовин, які заважають визначенню кількості білків у зразку?
4. Як обчислюється вміст білка в рослинному матеріалі?

РОБОТА 8.3. ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ БІЛКОВОГО АЗОТУ В НАСІННІ ТА ВЕГЕТАТИВНИХ ОРГАНАХ РОСЛИН (ЗА МЕТОДОМ Х. Н. ПОЧИНКА)

Перебіг аналізу. Беруть наважку 1 г сирого або 0,25 г сухого рослинного матеріалу, переносять у ступку і розтирають із невеликою кількістю дистильованої води. Гомогенат переносять у хімічну склянку і ставлять його на електричну плитку. Вміст нагрівають майже до кипіння. Якщо дослідний матеріал містить велику кількість крохмалю, рідину нагрівають 10 хв на водяній бані за температури 40–50 °С. Далі до гарячого розчину додають 5 мл 3 % розчину сульфату міді, 5 мл 0,2 N розчину гідроксиду натрію, ретельно перемішують і залишають на 3 год для відстоювання. Після цього розчин фільтрують через паперовий беззольний фільтр (біла стрічка), осад декантують 2–3 рази гарячою водою до зникнення реакції на сульфат-іон з BaCl_2 .

Промитий осад із фільтром висушують у термостаті за температури 105 °С, приміщують у колбу К'єльдаля об'ємом 50 або 100 мл, додають 0,4 г сульфату калію, 0,3 мл 10 % розчину молібдату натрію, 3 мл концентрованої сірчаної кислоти, ставлять на плитку у нахиленому положенні і обережно нагрівають, не допускаючи підняття піни в колбі. Коли піна перестане утворюватися і розчин закипить, колбу накривають скляною пробкою або лійкою і спалюють протягом години. Далі розчин охолоджують 5 хв, пробку знімають і в колбу додають 3 краплі 30 % пероксиду водню, колбу знову ставлять на плитку. Обробку пероксидом водню повторюють кожні 15–20 хв до повного спалення рослинного матеріалу, про що свідчить просвітлення розчину. Після останнього додавання пероксиду водню суміш нагрівають ще 10 хв для повної руйнації H_2O_2 . Колбу охолоджують, обережно додають 10 мл дистильованої води. Розчин переносять у мірчу колбу об'ємом 50 мл, доводять його об'єм до мітки і ретельно перемішують. Паралельно спалюють контрольний зразок, який містить паперовий фільтр і всі реактиви.

У розчині, який отримано після спалювання органічних речовин, визначають азот хлорамінним методом. Для цього з дослідного розчину беруть 20 мл під час аналізу коріння, стебел та 10 мл під час аналізу листя, зерна та інших об'єктів. Додають одну краплю 0,1 % розчину метилоранжу і нейтралізують 2 N розчином NaOH до зміни забарвлення. Додають 10 мл фосфатного буферного розчину з pH 6,7, який містить бромід калію, перемішують і додають 5 мл 0,12 N розчину хлораміну. Колбу накривають склом, розчин перемішують круговими рухами і залишають на 25 хв. Після цього додають 2 мл 20 % розчину йодиду калію, 10 мл 8 % розчину шавлевої кислоти і йод, який утворився, титрують 0,02 N розчином тіосульфату натрію у присутності крохмалю, який додають наприкінці титрування. 1 мл 0,02 N розчину тіосульфату відповідає 0,09338 мг азоту. Вміст азоту обчислюють за формулою:

$$x = \frac{0,4699 \times V_1 \times K \times (a - b)}{V_2 \times n},$$

де:

x – вміст азоту у перерахунку на абсолютно суху речовину, мг/г;

V_1 – об'єм розчину, в якому розчинена наважка після спалення, мл;

K – нормальність розчину тіосульфату натрію;

V_2 – об'єм дослідного розчину, який взято для окислення азоту хлораміном, мл;

a – об'єм розчину тіосульфату натрію, який витрачено на титрування контролю, мл;

b – об'єм розчину тіосульфату натрію, який витрачено на титрування дослідного зразка, мл;

n – абсолютно суха наважка (для перерахунку на абсолютно суху речовину необхідно визначити вологість матеріалу за допомогою висушування за 105 °C), г;
0,4969 – нормальний титр азоту, помножений на 100 для перерахунку у відсотки.

Обладнання

1) хімічні склянки об'ємом 100 мл; 2) колби К'єльдаля з пробками; 3) електрична плита; 4) мірчі колби об'ємом 50 мл; 5) бюретки для титрування; 6) піпетки об'ємом 1, 5 та 10 мл; 7) мірчі циліндри; 8) колби для титрування об'ємом 250 мл; 9) сушильна шафа; 10) металевий бюкс.

Реактиви

1) хлорамін розчин 0,12 N; 2) фосфатний буфер з pH 6,7; 3) молібдат натрію (Na_2MoO_4) 10 % розчин; 4) перексид водню (H_2O_2); 5) сульфат калію (K_2SO_4) безаміачний; 6) сірчана кислота (H_2SO_4) концентрована; 7) гідроксид натрію (NaOH) 2 N розчин; 8) метилоранж 0,1 % розчин; 9) щавлева кислота ($\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$); 8 % розчин; 10) тіосульфат натрію ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 0,02 N розчин (готується з фіксаналу); 11) йодид калію (KI) 20 % розчин; 12) крохмаль 0,5 % розчин; 13) сульфат міді ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 3 % розчин.

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Що включає в себе поняття «білковий азот»?
2. Як білковий азот відокремлюється від інших речовин, що містять азот?
3. Для чого в розчин додається перексид водню під час спалювання рослинного зразка?
4. Навіщо спалюють контрольний зразок?
5. Як обчислюється вміст білкового азоту в рослинному матеріалі?

РОБОТА 8.4. ЕКСТРАКЦІЯ ТА ОЧИЩЕННЯ РОСЛИННИХ БІЛКІВ МЕТОДОМ ОСАДЖЕННЯ

Принцип методу. Дослідження рослинних білків, особливо білків, які містяться в листі, пов'язано з деякими труднощами внаслідок того, що значна їх частина знаходиться у клітині або в її органоїдах у комплексі з ліпідами, пігментами та іншими речовинами.

Під час роботи з пігментованими рослинними тканинами необхідно провести додаткову обробку матеріалу органічними розчинниками, яка необхідна для видалення фенольних сполук, що можуть вступати у взаємодію з реактивом Фоліна. Визначення білка у хлоропластах без обробки ацетоном дає завищені на 15–20 % результати. Щоб уникнути втрати білка ліпопротеїдних фракцій, треба використовувати сильно охолоджені розчинники з температурою не вище 10 °C.

До того ж необхідно уникати підкислення органічного розчинника, тому що в такому разі сильно збільшується розчинність ліпопротеїдів.

Перебіг аналізу. Наважку рослинного матеріалу (50–60 мг) подрібнюють у ступці або у гомогенізаторі з 50 % трихлороцтовою кислотою. Гомогенат кількісно переносять у центрифугальну пробірку та центрифугують за 1 000 g (4 000 об./хв, точну відповідність можна визначити за номограмою, рис. 1д додатків) протягом 5–10 хв. Надосадову рідину зливають, а осад промивають 5 % трихлороцтовою кислотою. Для цього до осаду додають 3–5 мл 5 % трихлороцтової кислоти, перемішують скляною паличкою та центрифугують за 1 000 g протягом 5–10 хв. Надосадову рідину зливають, а осад послідовно промивають 1 % трихлороцтовою кислотою та водою, повторюючи усі попередні операції. Далі осад промивають охолодженим 95 % ацетоном до повного зникнення зеленого забарвлення надосадової рідини. Осад під час промивання ацетоном центрифугують за умови охолодження. Промитий осад розчиняють у 2 мл 0,5 N NaOH за умови нагрівання у киплячій водяній бані протягом 5 хв. Осад, який залишився після розчинення, відокремлюють за допомогою центрифугування або фільтрування через скляний фільтр, з'єднаний з колбою Бунзена. Надосадову речовину (фільтрат) кількісно переносять у мірчу колбу об'ємом 10 мл, звідки беруть частину для визначення кількості білка методом Лоурі.

Обладнання

1) ступка з товкачиком; 2) центрифуга; 3) центрифугальні пробірки; 4) колба Бунзена з фільтром Шотта № 3 або № 4; 5) мірчі колби об'ємом 10 мл; 6) мірчі піпетки.

Реактиви

1) 50 % трихлороцтова кислота (CCl_3COOH); 2) 5 % трихлороцтова кислота; 3) 1 % трихлороцтова кислота; 4) 95 % ацетон; 5) 0,5 N гідроксид натрію (NaOH).

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Як відбувається виділення білка з рослинного матеріалу методом осадження?
2. Як позбутися речовин, які заважають визначенню білка у методі осадження?

РОБОТА 8.5. ЕКСТРАКЦІЯ ТА ОЧИЩЕННЯ РОСЛИННИХ БІЛКІВ МЕТОДОМ ДІАЛІЗУ

Перебіг аналізу. Наважку 1–2 г свіжого рослинного матеріалу заморожують у холодильнику та розтирають в охолодженій фарфоровій ступці до гомогенного стану. Гомогенат заливають 10 % розчином хлориду натрію (забуференим до

pH 7) у співвідношенні 5 мл на 1 г наважки та ставлять у холодильник на 8 год. Далі гомогенат центрифугують за 5 000 об./хв протягом 5 хв.

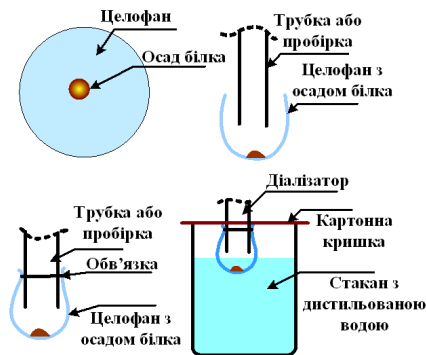


Рис. 34. Послідовні стадії виготовлення діалізатора

Надосадову рідину зливають і зберігають у холодильнику. Осад, який залишився, заливають 10 % розчином хлориду натрію у співвідношенні 1 : 10. Другу екстракцію білків проводять протягом 5 год у холодильнику. Після цього центрифугують і надосадову рідину об'єднують із першою порцією екстракту. В отриманому екстракті осаджують білки сульфатом амонію за 75 % насичення (табл. 7д додатків). Після осадження білка його центрифугують. Отриманий білок діалізують проти дистильованої води за температури 4–5 °С (у холодильнику) протягом 16–18 год. Для цього з целофану вирізають круг діаметром 9–10 см, намочують дистильованою водою та вирівнюють його поверхню на столі. У центр круга переносять осад білка з центрифугальної пробірки. Краї целофану закріплюють ниткою або гумовою стрічкою на скляній трубці або пробірці (рис. 34). Підготовлений діалізатор занурюють у хімічну склянку або іншу посудину об'ємом 0,5–1 л із дистильованою водою. Після діалізу вміст целофанового мішечка переносять у центрифугальні пробірки та центрифугують. У надосадовій рідині містяться водорозчинні білки, їх кількість визначають колориметричним методом.

Обладнання

1) ступка з товкачиком; 2) холодильник; 3) центрифуга та центрифугальні пробірки; 4) діалізатор; 5) целофан.

Реактиви

1) хлорид натрію (NaCl) 10 % розчин; 2) сульфат амонію ((NH₄)₂SO₄).

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАТЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. У чому полягає принцип методу осадження білка сульфатом амонію? Які фракції білка за таких умов осаджуються?
2. Навіщо проводиться діаліз розчину білка?

РОБОТА 8.6. ФРАКЦІОНУВАННЯ БІЛКА ТА КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ОКРЕМИХ ФРАКЦІЙ

Принцип методу. Усі відомі білки поділяються на дві групи: прості білки – протеїни, які складаються тільки з амінокислот, та складні білки – протеїди, у яких прості білки поєднуються з різними небілковими речовинами.

Прості білки за їх відношенням до розчинників (вода, спирт, розведені розчини солей, кислоти та луги) поділяються на декілька груп.

Альбуміни – добре розчиняються у воді, розчинах солей, кислот та лугів. Ці білки складають основну масу білків протопласту клітин.

Глобуліни – погано розчиняються у воді, але добре розчиняються у розведених розчинах солей, кислот та лугів. Глобуліни у великій кількості містяться у насінні рослин як запасні білки.

Проламіни (гліадини) – не розчиняються у воді, але добре розчиняються у 70–80 % етанолі, розведених кислотах та лугах. Містять велику кількість глютамінової кислоти та проліну. Знаходяться у зернах злаків.

Глютеніни нерозчинні у воді та нейтральних розчинах солей, але розчиняються у розведених розчинах кислот та лугів. Містяться у злаках.

Визначення вмісту різних груп білкових речовин за дотримання умов аналізу дає можливість характеризувати біохімічні процеси, пов'язані з перетворенням речовин під час росту та розвитку рослин під впливом різних факторів.

Фракційний склад білків визначають у повітряно-сухому насінні та свіжих вегетативних органах рослин. Під час висушування рослинного матеріалу за позитивних температур відбуваються небажані зміни у співвідношенні фракцій білка. Тому для аналізу використовують або свіжий рослинний матеріал, або після ліофільної сушки (вода видаляється в умовах глибокого вакууму із замороженого об'єкта).

Білкові речовини екстрагують послідовно дистильованою водою, 10 % розчином хлориду натрію, 70–80 % етанолом і наприкінці 0,2 % розчином лугу. Екстракти збирають у окремі посудини і осаджують білки оцтовою кислотою або сульфатом міді та лугом. Осади білкових речовин фільтруються та спалюються сірчаною кислотою. В отриманому розчині вміст азоту визначають хлорамінним методом. Можна використовувати фотометричні методи визначення вмісту білка (осадження з розчинів непотрібне).

Перебіг аналізу. Для аналізу беруть 0,5 г повітряно-сухого борошна бобових рослин, 1 г борошна злаків, 5 г вегетативних органів (бульб, листя тощо). Наважку ретельно подрібнюють і екстрагують водорозчинну фракцію, далі – солерозчинну, далі – фракцію, розчинну у спирті, і нарешті фракцію, розчинну у лугу. У залишку містяться складні білки.

Альбуміни

Наважку приміщують у фарфорову ступку, додають невелику кількість дистильованої води і розтирають до однорідної маси. Вміст ступки переносять у центрифугальну пробірку, змиваючи ступку дистильованою водою з таким розрахунком, щоб на промивання витрачалось не більше 15 мл води. Масу у пробірці перемішують скляною паличкою. Паличку змивають декількома краплями води, а розчин центрифугують протягом 3–5 хв за 2 500 об./хв і прозорий розчин зливають у склянку. До осаду у пробірці додають 15 мл дистильованої води, перемішують 5 хв паличкою, центрифугують і розчин об'єднують із першою порцією. Екстрагування повторюють тричі.

Із отриманого розчину осаджують чистий білок оцтовою кислотою. Для цього додають 10 крапель концентрованої оцтової кислоти і нагрівають на водяній бані протягом 5–10 хв до випадіння осаду. Після цього фільтрують через беззольний фільтр діаметром 7 см, збирають весь осад на фільтр, промивають 4 рази 1 % оцтовою кислотою і фільтр із осадом висушують у термостаті. Осад білка, який отримано наведеним методом, можна відокремити центрифугуванням. Далі осад розчиняють відповідним буферним розчином і визначають вміст білка фотометричними методами.

Глобуліни

До залишку у центрифугальній пробірці додають 15 мл 10 % розчину хлориду натрію, перемішують скляною паличкою протягом 5 хв, після чого паличку промивають сольовим розчином. Вміст пробірки центрифугують і зливають розчин у склянку. Екстракцію проводять 4 рази. Для осадження білка та визначення його кількості використовують методику, описану у попередньому методі (екстракція альбумінів).

Проламіни

Розчинні у спирті білки містяться у злаках (кукурудза, ячмінь, пшениця, жито тощо) і відсутні в бобових рослинах.

До залишку після екстракції розчином солі додають 10 мл 70 % етанолу, перемішують паличкою і суміш нагрівають у водяній бані за температури 80 °C протягом 5 хв, постійно перемішуючи. Після нагрівання пробірку виймають із бані, перемішують ще 5 хв, центрифугують, розчин зливають у склянку. Екстракцію повторюють 4 рази.

Для осадження білка спиртовий розчин розводять водою у 2 рази, додають 10 крапель концентрованої оцтової кислоти і нагрівають до кипіння. Суміш фільтрують або центрифугують. Білок визначають одним із фотометричних методів. Треба звернути увагу на те, що у спиртовій фракції визначення білка з кумасі діамантовим блакитним (методи Бредфорда та Шепілової) ускладнено.

Глютеніни

До залишку у центрифугальній пробірці після екстракції спиртом додають 15 мл 0,2 % розчину гідроксиду натрію. Вміст перемішують протягом 5 хв скляною паличкою, центрифугують і зливають у склянку. Екстракцію проводять 4 рази.

Для осадження білка додають 5 мл 10 % розчину трихлороцтової кислоти, перемішують і знову додають краплями розчин трихлороцтової кислоти, постійно перемішуючи розчин, до появи осаду білка. Далі суміш фільтрують або центрифугують, осад промивають 1 % оцтовою кислотою.

Для осадження за Бернштейном до лужного екстракту додають 2 мл розчину сірчаної кислоти для нейтралізації надлишку лугу, перемішують, додають 5 мл 3 % розчину сульфату міді та нагрівають до 70–80 °С, дають відстоятися і фільтрують або центрифугують. Осад промивають дистильованою водою.

Важкорозчинні (складні) білки

У залишку після екстрагування різних фракцій білків визначають важкорозчинні білки. Для цього залишок із пробірки переносять з допомогою невеликої кількості дистильованої води в колбу К'ельдаля об'ємом 50 мл, додають 0,4 г сульфату калію, 0,3 мл 10 % розчину молібдату натрію та 3 мл концентрованої сірчаної кислоти. Колбу встановлюють на електричну плитку і нагрівають до випаровування води та обвуглювання матеріалу, не допускаючи підняття піни у горлі колби. Коли зникне піна і розчин закипить, колбу накривають скляною пробкою або лійкою і продовжують нагрівати до повного просвітлення розчину. Для прискорення спалення у розчин періодично додають 30 % пероксид водню. У такий спосіб можна спалювати і білки усіх інших фракцій.

Після спалення вміст колб К'ельдаля кількісно переносять у мірчі колби об'ємом 50 мл. Доводять об'єм до 50 мл безаміачною водою і визначають азот хлорамінним методом (див. роботу 8.3).

Вміст азоту у кожній фракції обчислюють за формулою:

$$X = \frac{0,4669 \times 50 \times K \times (a - b)}{V \times n},$$

де:

X – вміст азоту у цій фракції білка у розрахунку на абсолютно суху наважку, %;

50 – загальний об'єм, у якому розчинено залишок після спалення фракції білка, мл;

V – об'єм дослідного розчину, який взято для окислення азоту хлораміном, мл;

n – абсолютно суха наважка дослідної речовини, г;

a – об'єм 0,02 N розчину тіосульфату натрію, який витрачено на титрування контрольного розчину, мл;

b – об’єм 0,02 N розчину тіосульфату натрію, який витрачено на титрування дослідного розчину, мл;

K – нормальність розчину тіосульфату натрію.

Для визначення абсолютно сухої маси у паралельному зразку визначають вміст води, висушуючи його за температури 105 °С до постійної ваги.

Отримані результати перераховують відносно загального вмісту азоту в усіх білкових фракціях, приймаючи його за 100 %. Так отримують відносний вміст фракцій білка:

$$X = \frac{100 \times a}{c},$$

де:

X – відносний вміст фракції білка до загального вмісту білка, %;

a – вміст азоту у фракції білка, який обчислено за попередньою формулою, %;

c – сума азоту, який міститься в усіх фракціях білків, %.

Обладнання

1) хімічні склянки; 2) ступка з товкачиком; 3) центрифуга; 4) центрифугальні пробірки; 5) колби К’ельдаля; 6) водяна баня; 7) електрична пічка; 8) сушильна шафа.

Реактиви

1) хлорид натрію (NaCl) 10 % розчин; 2) етанол 70 % розчин; 3) гідроксид натрію (NaOH) 0,2 % розчин; 4) трихлороцтова кислота (CCl₃COOH) 10 % розчин; 5) оцтова кислота (CH₃COOH) концентрована та 10 % розчин; 6) реактиви для визначення азоту хлорамінним методом (робота 8.3).

Приготування реактивів

Реактив № 1 (розчин хлориду натрію (10 %)). Зважують 100 г NaCl марки х. ч. і розчиняють у безаміачній дистильованій воді. Об’єм розчину доводять до 1 л безаміачною водою.

Реактив № 2 (розчин етанолу (70 %)). До 100 мл 95 % етанолу додають 27 мл безаміачної дистильованої води, перемішують і зберігають у щільно закритій пляшці.

Реактив № 3 (розчин гідроксиду натрію (0,2 %)). Зважують 2 г NaOH марки х. ч., розчиняють у безаміачній дистильованій воді, доводять об’єм до 1 л безаміачною дистильованою водою. Зберігають без доступу повітря.

Реактив № 4 (розчин трихлороцтової кислоти (10 %)). 100 г CCl₃COOH розчиняють у безаміачній дистильованій воді, розводять розчин до 1 л безаміачною водою і ретельно перемішують.

Безаміачна вода. Дистильовану воду наливають у хімічну склянку, ставлять на електричну плитку, нагрівають до кипіння і кип’ятять протягом 30–40 хв. На-

кривають скляною кришкою, охолоджують і відразу використовують. Для зберігання потрібен спеціальний посуд, у пробку якого вставлена трубка Алена, заповнена лугом або аскаритом.

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. На які фракції поділяються білки рослинних тканин?
2. Як розділити білки на окремі фракції з допомогою методу фракціонування?
3. Якими методами можна визначити кількісний вміст білків у кожній із фракцій?
4. Як обчислити процентний вміст білків кожної фракції відносно загальної їх кількості?
5. Чому потрібно чітко дотримуватися послідовності виділення фракцій білка?

РОБОТА 8.7. ВИЗНАЧЕННЯ КІЛЬКОСТІ БІЛКА ЗА ДОПОМОГОЮ РЕАКТИВУ ФОЛІНА–ЧОКАЛЬТЕУ (МЕТОД ЛОУРІ)

Перебіг аналізу. 0,4 мл розчину білка змішують з 2 мл лужного мідного реактиву (реактив № 1). Суміш ретельно перемішують. Через 10 хв додають 0,2 мл розведеного реактиву Фоліна і знову ретельно перемішують. Через 30 хв визначають оптичну густину розчину на спектрофотометрі або фотоелектроколориметрі за довжини хвилі 750 нм (червоний світлофільтр) у кюветі з оптичним шляхом 3 мм. Обчислення проводиться за калібрувальним графіком, який будеться за кристалічним чистим альбуміном або γ -глобуліном.

Побудова калібрувального графіка

Беруть 100 мг чистого γ -глобуліну або кристалічного альбуміну, розчиняють у 100 мл 0,1 N NaOH. Далі у 9 мірчих колб на 100 мл вносять білковий розчин у кількості 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 та 8 мл. Об'єм розчину в колбах доводять до 100 мл. Замість колб можна брати калібровані на 10 мл пробірки. У такому разі кількість розчину білка зменшується в 10 разів.

Після цього з кожної колби (пробірки) у пробірки відбирають по 0,4 мл, додають 2 мл лужного мідного реактиву (реактив № 1), вміст пробірок перемішують і залишають на 10 хв. Далі в пробірки додають по 0,2 мл розведеного реактиву Фоліна, ретельно перемішують. Оптичну густину визначають через 30 хв на фотоелектроколориметрі або спектрофотометрі за червоним світлофільтром (довжина хвилі – 750 нм) у кюветі з оптичним шляхом 3 мм. На осі абсцис відкладають концентрацію білка, а на осі ординат – оптичну густину.

Обладнання

- 1) ступка з товчачиком; 2) пробірки зі штативом; 3) піпетки об'ємом 1, 5 та 10 мл; 4) мірчі циліндри об'ємом 25 та 250 мл; 5) мірчі колби об'ємом 100 мл;

6) центрифуга з центрифугальними пробірками; 7) склянки хімічні об'ємом 500–1 000 мл; 8) фотоелектроколориметр або спектрофотометр.

Реактиви

1) лужний мідний реактив; 2) реактив Фоліна; 3) сірчаноокислий амоній; 4) трихлороцтова кислота; 5) хлорид натрію (NaCl) 10 % розчин; 6) вуглекислий натрій; 7) сульфат мідь (мідний купорос, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$); 8) виннокислий натрій або виннокислий калій; 9) нітрат натрію двоховдний ($\text{NaNO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$); 10) молібдат натрію; 11) концентрована фосфорна кислота (H_3PO_4); 12) концентрована соляна кислота (HCl); 13) сульфат літію (Li_2SO_4); 14) бром; 15) фенолфталеїн 0,1 % розчин у 60 % спирті; 16) альбумін або γ -глобулін.

Приготування реактивів

Реактив № 1 (лужний мідний реактив). Готують 2 % розчин Na_2CO_3 у 0,1 N NaOH (розчин 1) та 0,5 % розчин $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ у 1 % розчині тартрату натрію або калію (розчин 2). Реактив № 1 отримують, змішуючи 1-й та 2-й розчини у співвідношенні 50 : 1 за об'ємом.

Реактив № 2 (реактив Фоліна). 100 г $\text{NaNO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ та 25 г $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ розчиняють у 700 мл води у круглодонній колбі об'ємом 1 л, яка з'єднується з пришліфованим холодильником Лібіха. Додають 50 мл 85 % фосфорної кислоти та 100 мл концентрованої HCl . У колбу примішують декілька капілярів. Суміш кип'ятять протягом 10 год. Далі додають 150 г сульфату літію, 50 мл води та декілька крапель бром. Зворотний холодильник від'єднують і кип'ятять суміш протягом 15 хв у витяжній шафі для видалення надлишку бром. Розчин охолоджують, його об'єм доводять дистильованою водою до 1 л та фільтрують через паперовий фільтр. Розчин повинен бути яскраво-жовтого кольору.

Перед проведенням дослідів реактив Фоліна титрують 1 N розчином луку (NaOH або KOH) у присутності фенолфталеїну та обчислюють його нормальність. На основі отриманих результатів реактив Фоліна розводять дистильованою водою до концентрації, що відповідає 1 N розчину HCl .

Реактив № 3 (яєчний альбумін). Білок двох свіжих яєць ретельно відокремлюють від жовтка і вимірюють їх об'єм. До білка додають рівний об'єм насиченого розчину сульфату амонію. Суміш переносять у конічну колбу і ретельно перемішують та чекають випадіння осаду. В осад випадають глобуліни, їх фільтрують через паперовий фільтр. До фільтрату додають тонко розтертий порошок сульфату амонію з розрахунку 13,5 г на кожні 100 мл розчину, довго перемішують скляною паличкою до повного розчинення кристалів сульфату амонію. Через деякий час випадає осад альбуміну. Його відокремлюють фільтруванням або центрифугуванням. Осад переносять у хімічну склянку об'ємом 50 мл і розчиняють у мінімальній кількості води. До отриманого розчину краплями додають за умови постійного перемішування 4 % розчин оцтової кислоти до досягнення

pH розчину 4,7–4,8. До розчину додають невеликими порціями насичений розчин сульфату амонію до тих пір, поки не з'явиться каламуть. Скланку накривають склом і залишають у холодильнику. Через добу або більше випадають голчасті кристали ясного альбуміну.

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАТЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Як проводиться визначення вмісту білка за методом Лоурі?
2. Як готується реактив Фоліна?
3. Які речовини заважають визначенню білка? Як позбутися їх?
4. Як будується калібрувальний графік?
5. Дайте характеристику методу отримання чистого альбуміну.

РОБОТА 8.8. КОЛОРИМЕТРИЧНЕ ВИЗНАЧЕННЯ БІЛКА ЗА ДОПОМОГОЮ БІУРЕТОВОЇ РЕАКЦІЇ

Перебіг аналізу. До 2 мл розчину білка (вміст 0,02–0,53 мг/мл) додають 1 мл реактиву № 1. Ретельно перемішують і залишають за кімнатної температури протягом 5 хв. Через 5 хв вимірюють оптичну густину розчину проти «холостого» досліду. Для цього готують такі суміші: X_1 – 2 мл розчину білка + 1 мл реактиву № 1; X_2 – 2 мл дистильованої води + 1 мл реактиву № 1; Y_1 – 2 мл розчину білка + 1 мл реактиву № 2; Y_2 – 2 мл дистильованої води + 1 мл реактиву № 2. Вимірюють оптичну густину розчину X_1 з використанням як «холостого» досліду суміші X_2 та оптичної густини розчину Y_1 проти реактиву Y_2 . Оптична густина білка буде дорівнювати різниці $X_2 - Y_2$. Для обчислення кількості білка використовують калібрувальний графік, який побудовано за результатами вимірів оптичної густини розчинів ясного альбуміну або бичачого сироваткового альбуміну у межах концентрацій від 0,02 до 0,50 мг/мл.

Цей метод може бути використаний у присутності ДНК (до 0,7 мг/мл). Забарвлення розвивається приблизно через 5 хв і зберігається протягом 2,5 год. Цей метод менш чутливий, ніж метод Лоурі, але він дає відтворювані результати на різних за природою білках. На реакцію не впливає присутність NaCl, ацетату натрію, формиату натрію, хлорної кислоти та фосфату натрію однозаміщеного. Заважає визначенню присутність сечовини.

Обладнання

- 1) пробірки об'ємом 5–7 мл; 2) фотоелектроколориметр або спектрофотометр.

Реактиви

- 1) реактив № 1 (0,21 % розчин $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ у 30 % NaOH); 2) реактив № 2 (30 % розчин NaOH).

Приготування реактивів

Реактив № 1. 21 мл 1 % розчину $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ у воді додають до 75 мл 40 % розчину NaOH . Об'єм розчину доводять до 100 мл. Додавання розчину гідроксиду натрію проводиться обережно, малими порціями для уникнення випадіння осаду гідроксиду міді.

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Дайте характеристику принципу біуретового методу визначення кількості білка.
2. Як проводиться колориметрування розчинів та обчислення вмісту білка у рослинах?
3. Порівняйте біуретовий метод та метод Лоурі (чутливість, специфічність).

РОБОТА 8.9. КОЛОРИМЕТРИЧНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ БІЛКА ЗА ДОПОМОГОЮ БІУРЕТОВОЇ РЕАКЦІЇ

Принцип методу. Білки реагують у лужному середовищі з тартратом міді (II) з утворенням сполук фіолетового забарвлення (біуретова реакція). За оптичною густиною проби визначають вміст загального білка. Для цього використовують або вимірювання оптичної густини калібрувального розчину, або будують калібрувальний графік, вимірюючи оптичну гуστину серії розчинів зі стандартними концентраціями. Лінійна область визначення концентрації білка за допомогою цього методу становить від 10,0 до 100,0 мг/мл. Отримані результати відтворювані – коефіцієнт варіації не перевищує 3 %. Наведений метод простіший у використанні, ніж попередній. Тому він придатний для масових аналізів.

Перебіг аналізу. Для визначення у рослинному матеріалі альбумінів готують водний екстракт білка за методиками, наведеними у попередніх роботах. Визначення глобулінів проводять у сольовому розчині. Можна також використовувати метод послідовної екстракції (фракціонування) білків, що дасть змогу більш докладно охарактеризувати їх розподіл у рослинному матеріалі. Залежно від наявного обладнання та кількостей рослинної витяжки можна застосовувати макрометод або напівмікрометод. Кількість розчинів, необхідна для проведення аналізу, наведена у табл. 4.

Внесені розчини ретельно перемішують. Витримують 30 хв за кімнатної температури. Оптичну гуστину дослідного розчину вимірюють проти холостої проби (залежно від методу 0,10 або 0,05 мл дистильованої води та 5,00 або 2,50 мл біуретового реактиву). Як стандартний зразок застосовують розчин альбумінів у дистильованій воді з концентрацією 60 мг/мл. 0,10 або 0,05 мл розчину вносять у кювету, додають 5,00 або 2,50 мл біуретового реактиву, ретельно перемішують, витримують 30 хв і вимірюють оптичну гуστину.

Таблиця 4. Об'єми розчинів, що додаються у кювети для вимірювання оптичної густини, мл

<i>Компоненти</i>	<i>Об'єм розчину, мл</i>	
	<i>Макрометод</i>	<i>Напівмікрометод</i>
<i>Екстракт білка</i>	<i>0,10</i>	<i>0,05</i>
<i>Біуретовий реактив</i>	<i>5,00</i>	<i>2,50</i>

Для побудови калібрувального графіка застосовують калібрувальний розчин, із якого готують серію стандартних розчинів із концентрацією білка від 10 до 100 мг/мл. Далі вимірюють оптичну густину розчинів, для чого 0,10 або 0,05 мл стандартного розчину вносять у кювети, додають туди 5,00 або 2,50 мл біуретового реактиву, витримують 30 хв та вимірюють оптичну густину.

Для вимірювання оптичної густини використовують фотоелектроколориметр (зелений світлофільтр) або спектрофотометр із довжиною хвилі 540–560 нм. Під час використання макрометоду застосовують кювети з довжиною оптичного шляху 10 мм, за напівмікрометоду використовуються кювети з оптичним шляхом 5 мм.

Вміст загального білка розраховують за формулою:

$$C_{\text{БІЛКА}} = \frac{C_{\text{КАЛІБР.}} \times E_{\text{ДОСЛІД.}}}{E_{\text{КАЛІБР.}}},$$

де:

$C_{\text{білка}}$ – концентрація білка у екстракті, мг/мл;

$C_{\text{калібр.}}$ – концентрація білка у стандартному розчині (60,0), мг/мл;

$E_{\text{дослід.}}$ – оптична густина екстракту білка;

$E_{\text{калібр.}}$ – оптична густина стандартного розчину.

Вміст білка в рослинному матеріалі розраховують за формулою:

$$A = \frac{C_{\text{білка}} \times V}{n},$$

де:

A – вміст білка у рослинному матеріалі, мг/г сирової маси;

$C_{\text{білка}}$ – концентрація білка у дослідному екстракті, мг/мл;

V – об'єм екстракту білка, мл;

n – наважка рослинного матеріалу, г.

Обладнання

1) лабораторні пробірки ємністю 10 мл; 2) піпетки ємністю 0,1 і 5,0 мл; 3) лабораторні медичні дозатори; 4) мірча колба ємністю 50 мл; 5) штатив для пробірок; 6) таймер; 7) фотоелектроколориметр або спектрофотометр, кювети з довжиною оптичного шляху 10 або 5 мм.

Реактиви

Для проведення аналізу можна використовувати стандартні набори реактивів, до складу яких входять калібрувальний розчин білка (60,0±1,0) г/л та концент-

рований біуретовий розчин. Ці набори застосовуються у клінічних лабораторіях для аналізу крові.

У разі відсутності готових наборів для проведення роботи необхідні такі реактиви:

- 1) альбумін курячого яйця; 2) калію натрію тартрат ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$); 3) йодид калію (KI); 4) сульфат міді ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$); 5) гідроксид натрію (NaOH).

Приготування реактивів

За умов використання стандартного набору виробництва Дніпровської лабораторії калібрувальний розчин готовий до використання, а біуретовий реактив потрібно розвести дистильованою водою в 10 разів.

Приготування реактивів за умови відсутності стандартного набору:

Калібрувальний розчин. 300 мг яєчного альбуміну зважують на аналітичних терезах і розчиняють у дистильованій воді. Об'єм розчину доводять до 5 мл. Розчин зберігається у холодильнику до двох тижнів.

Біуретовий реактив. Зважують 87,49 г калію натрію тартрату і розчиняють у 500–600 мл дистильованої води. У розчин додають 49,83 г йодиду калію, 29,96 г сульфату міді та 0,10 г гідроксиду натрію. Об'єм розчину доводять до 1 000 мл. Розчин може зберігатися декілька місяців. Перед застосуванням розчин розводять у 10 разів.

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Наведіть принцип методу визначення кількості білка за допомогою біуретового методу.
2. Порівняйте цей метод з аналогічним методом, наведеним у попередній роботі.
3. Як ви думаєте, чи можна цим методом визначити проламіни та глютеїни? Якщо ні, то чому?
4. Якими способами можна отримати витяжки рослинних білків для застосування цього методу?

РОБОТА 8.10. ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ БІЛКА ЗА ДОПОМОГОЮ КУМАСІ ДІАМАНТОВОГО БЛАКИТНОГО ЗА МЕТОДОМ БРЕДФОРДА

Перебіг аналізу. Розчин білка, отриманий одним з наведених вище методів (метод осадження, метод діалізу або фракціонування, крім спиртових розчинів) у кількості, яка містить 10–100 мкг, наливають у пробірку (12×100 мм), розводять до 0,1 мл 0,15 М розчином NaCl. Додають 5 мл розчину барвника (реактив 1) і перемішують на вібромішалці. Через 2 хв вимірюють оптичну густину

на спектрофотометрі за довжини хвилі 595 нм проти контрольного розчину (0,1 мл відповідного розчинника білка + 5 мл барвника).

Наведений метод приблизно в 4 рази більш чутливий, ніж метод Лоурі. Забарвлення стабільне протягом 1 год. Катехоламіни, хлориди, сульфати та етанол не заважають визначенню білка. Заважати визначенню можуть буферні компоненти з лужними властивостями, оцтова кислота, сахароза та гліцерин.

Обладнання

1) пробірки; 2) спектрофотометр.

Реактиви

1) кумасі діамантовий блакитний G-250 (фірми Sigma); 2) хлорид натрію (NaCl) 0,15 М розчин.

Приготування реактивів

Реактив № 1. 100 мг кумасі G-250 (фірми Sigma) розчиняють у 50 мл 95 % етанолу. До розчину додають 100 мл 85 % ортофосфорної кислоти і об'єм доводять до 1 л дистильованою водою. Отриманий розчин фільтрують. Термін зберігання за 20 °С складає 2 тижні.

РОБОТА 8.11. ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ БІЛКА З ДОПОМОГОЮ КУМАСІ ДІАМАНТОВОГО БЛАКИТНОГО У МОДИФІКАЦІЇ С. В. ШЕПІЛОВОЇ

Принцип методу. В основу методу покладено здатність барвника кумасі діамантового блакитного (кумасі яскраво-синього) G-250, який містить сульфатні групи, в сильно-кислому середовищі зв'язуватися з аміно- та іміногрупами білка. Така взаємодія призводить до зсування максимуму поглинання світла з 465 до 595 нм. Ця властивість використовується під час спектрофотометричного визначення білка. Метод швидкий, високочутливий, простий у технічному виконанні.

Перебіг аналізу. Рослинну тканину (2 г листя) гомогенізують у фарфоровій ступці з 30 мл 10 мкМ К-фосфатного буфера рН 7,2. Гомогенат фільтрують через тканину, центрифугують 10 хв за 1 000 g (3 000 об./хв) і надосадову рідину використовують для визначення білка у грубих препаратах (фракція 1). У залишку фракції 1 білок осаджують 70 % насиченням сульфату амонію $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Осад збирають центрифугуванням протягом 20 хв за 2 000 g (6 000 об./хв) і розчиняють у 5–7 мл відповідного буферного розчину. Нерозчинену частину відокремлюють повторним центрифугуванням, а розчин використовують для визначення вмісту білка (фракція 2). Після 18–20-годинного діалізу цього самого білкового розчину в ньому визначають вміст білка (фракція 3). Можна також використовувати розчини білка після фракціонування, розводячи їх відповідним роз-

чинником або буферним розчином після осадження з таким розрахунком, щоб вміст білка у розчині не виходив за межі чутливості методу.

Для визначення білка з кумасі беруть 0,1 мл білкового розчину, який містить 2–20 мкг білка, додають 2 мл розчину барвника і вимірюють оптичну густину на спектрофотометрі за довжини хвилі 595 нм проти води або відповідного буферного розчину.

Застосування методу дає змогу визначити вміст білка у грубих гомогенатах із рослинних тканин. Присутність достатньо великих кількостей фенолів (до 250 мкг) не впливає на результати аналізу.

Обладнання

1) фарфорова ступка з товкачиком; 2) колби об'ємом 50 або 100 мл; 3) пробірки; 4) центрифуга; 5) центрифугальні пробірки; 6) спектрофотометр або фотоелектроколориметр; 7) тканина для фільтрування (краще капрон).

Реактиви

1) К-фосфатний буфер, pH 7,2; 2) розчин кумасі (G-250).

Приготування реактивів

Реактив № 1 (К-фосфатний буфер). Готують 10 мМ розчину фосфату калію однозаміщеного (0,0136 г KH_2PO_4 розчиняють у 700–800 мл H_2O та доводять дистильованою водою об'єм розчину до 1 л) та гідроксиду калію (0,0056 г КОН розчиняють у 700–800 мл води та доводять об'єм розчину до 1 л). Для отримання pH 7,2 змішують 5 мл розчину фосфату калію та 3,47 мл розчину гідроксиду калію. Об'єм розчину доводять до 20 мл дистильованою водою.

Реактив № 2. 50 мг кумасі яскраво-синього G-250 (фірми Serva або фірми Sigma) розчиняють у 50 мл 95 % етанолу і змішують з 100 мл 85 % ортофосфорної кислоти. Суміш розводять до 1 л дистильованою водою і фільтрують для видалення барвника, який не розчинився. Розчин стійкий протягом 1–2 тижнів.

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

(до робіт 8.11 та 8.12)

1. У чому полягає принцип методу визначення білка за допомогою кумасі яскраво-блакитного (діамантового блакитного)?

2. Які речовини можуть заважати визначенню кількості білка?

3. Які переваги мають методи з використанням кумасі яскраво-блакитного, порівняно з попередніми?

4. Чим відрізняються метод Бредфорда та його модифікація (модифікація Шепілової)?

РОБОТА 8.12. СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНИЙ МЕТОД ВИЗНАЧЕННЯ БІЛКА

Принцип методу. Спектрофотометричний метод кількісного визначення білка оснований на здатності ароматичних амінокислот (триптофан і тирозин) поглинати ультрафіолетове світло з максимумом поглинання при 280 нм. Отже, вимірюючи величину оптичної густини за цієї довжини хвилі, можна визначати кількість білка, що присутня у розчині.

Перебіг аналізу. Визначенню білка цим методом заважає присутність нуклеїнових кислот і нуклеотидів. Їх вплив можна виключити, вимірюючи оптичну густину розчину за 280 нм та за 260 нм, і далі розрахувати дійсний вміст білка за номограмою (рис. 2д додатків). На номограмі є три різні шкали, що відповідно позначають: оптичну густину за 260 і 280 нм і вміст білка в 1 мл досліджуваного розчину. Експериментально отримані величини оптичної густини за 260 і 280 нм знаходять у відповідних стовпцях номограми і з'єднують їх прямою лінією. На шкалі концентрації білка у точці перетинання з цією лінією визначають вміст білка в 1 мл розчину, узятого для виміру.

Концентрацію білка можна також визначити за формулою Lagne (1998):

$$C = 1,55 \times D_{280} - 0,76 \times D_{260},$$

де:

C – концентрація білка у розчині, мг/мл;

D_{280} – оптична густина розчину за 280 нм;

D_{260} – оптична густина розчину за 260 нм.

Спектрофотометричний метод є до деякої міри наближеним, тому що кількість зазначених ароматичних амінокислот у різних білках різна, і тому поглинання, що обумовлене такою самою кількістю різних білків, неоднакове. Достатньою мірою умовно можна вважати, що за умови концентрації «усередненого» білка в розчині, рівній 1 мг/мл, величина оптичної густини за 280 нм дорівнює 1,0 (передбачається використання спектрофотометричної кювети товщиною 1 см).

Якщо білок виділено у чистому вигляді, то можна визначити, яка величина оптичної густини буде відповідати, наприклад, 1 мг цього білка. Користуючись цим співвідношенням, у подальшій роботі з чистими препаратами цього білка стає можливим уже точно визначати його концентрацію, використовуючи спектрофотометричний метод.

Незважаючи на недостатню точність, спектрофотометричний метод застосовується дуже широко: він швидкий, не вимагає яких-небудь реагентів, розчин білка після його виміру може бути використаний для подальшої роботи.

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. У чому полягає принцип методу визначення білка спектрофотометричним методом?
2. Які речовини можуть заважати визначенню кількості білка?
3. Які переваги та недоліки має метод?
4. Навіщо оптичну густину розчину вимірюють за двох довжин ультрафіолетового випромінювання?

РОБОТА 8.13. ФОТОМЕТРИЧНИЙ МІКРОМЕТОД ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ АМІННОГО АЗОТУ У РОСЛИНАХ (ЗА МЕТОДОМ Н. І. ЯСТРЕМБОВИЧА, Ф. Л. КАЛІНІНА)

Принцип методу. Метод оснований на перетворенні амінокислот у розчинні мідні солі. Вміст міді визначають у вигляді фероціаніду міді, який дає блідо-рожеве забарвлення розчину. Оптична густина розчину вимірюється на фотоелектроколориметрі. Кількісний вміст амінного азоту обчислюється за допомогою калібрувального графіка, який будується за стандартним розчином мідної солі.

Перебіг аналізу. Для досліду зважують 0,2 г добре подрібненого повітряно-сухого або 1–2 г сирого рослинного матеріалу, переносять у фарфорову ступку і розтирають з 3–5 мл дистильованої води. Гомогенат кількісно переносять у мірчу колбу об'ємом 25 мл з допомогою малих об'ємів дистильованої води. Колбу з гомогенатом ставлять у водяну баню з температурою 45–50 °C і нагрівають протягом 30 хв, періодично перемішуючи вміст колби. Після цього в екстракті осаджують білки, додаючи 2 мл 5 % розчину ZnSO_4 , перемішують і до екстракту додають краплями 0,5 мл 5 % розчину NaOH . Знову ретельно перемішують і перевіряють рН розчину за допомогою індикаторного паперу (реакція повинна бути нейтральною). Після осадження білків у дослідному екстракті його об'єм доводять дистильованою водою до 25 мл і фільтрують через фільтр Шотта № 3 або № 4.

Беруть 5 мл фільтрату в колбу Ерленмейера об'ємом 50 мл, додають 5 мл мідної фосфорнокислої суміші (реактив № 4) і збовтують протягом 10 хв. Паралельно готують контрольний зразок, додаючи замість фільтрату 5 мл дистильованої води та інші реактиви. Вміст колб фільтрують через паперові фільтри. Беруть 5 мл фільтрату у пробірку, попередньо калібровану на 10 мл, підкислюють 0,1 мл 10 % HCl , додають 1 мл фероціаніду (реактив № 5). Ретельно перемішують і об'єм рідини доводять водою до 10 мл. Знову перемішують і вимірюють оптичну густину забарвлених розчинів на фотоелектроколориметрі за зеленим світлофільтром, використовуючи кювети з оптичним шляхом 5 або 10 мм. Для порівняння використовують контрольний розчин.

Побудова калібрувального графіка

Готують стандартний розчин мідної солі (реактив № 6), який розводять водою у 10 разів. Один мл цього розчину містить 0,6092 мг мідної солі або 0,227 мг міді, які відповідають 0,1 мг амінного азоту. З отриманого розчину у каліброваних на 10 мл пробірках готують серію з шести розчинів, у першу пробірку вносять 0,2 мл, у другу – 0,4, у третю – 0,6, у четверту – 0,8, у п'яту – 1 мл стандартного розчину. У шосту пробірку наливають 1 мл дистильованої (краще бідистильованої) води. Далі в кожную пробірку додають по 0,1 мл 10 % HCl, 1 мл фероціаніду, доводять об'єм розчину до 10 мл водою, ретельно перемішують і вимірюють оптичну густину розчинів на фотоелектроколориметрі за зеленим світлофільтром, використовуючи кювети з товщиною шару рідини 5 або 10 мм (такі самі, як у досліді). На основі отриманих даних будують калібрувальний графік. Для цього на осі абсцис відкладають концентрацію азоту амінів, а на осі ординат – оптичну густину стандартних розчинів.

Вміст амінного азоту обчислюють за формулою:

$$X = \frac{100 \times a \times V}{n},$$

де:

X – вміст амінного азоту у рослинному матеріалі, мг/100 г;

a – кількість амінного азоту у дослідному розчині, яку знайдено за калібрувальним графіком, мг/мл;

V – загальний об'єм фільтрату, мл;

n – наважка рослинного матеріалу, г.

Обладнання

1) ступки з товчачиками; 2) мірчі колби об'ємом 25 мл; 3) водяна баня; 4) електрична плита; 5) термометр; 6) фільтр Шотта № 3 або № 4; 7) колба Бунзена; 8) конічні колби об'ємом 50 мл; 9) калібровані пробірки місткістю 10 мл; 10) скляні лійки; 11) паперові фільтри; 12) фотоелектроколориметр.

Реактиви

1) сульфат цинку ($ZnSO_4$) 5 % розчин; 2) гідроксид натрію (NaOH) 5 % розчин; 3) соляна кислота (HCl) 10 % розчин; 4) завись фосфорнокислої міді; 5) фероціанідний реактив; 6) стандартний розчин мідної солі.

Приготування реактивів

Реактив № 4 (завись фосфорнокислої міді). Готують три розчини:

1. 0,16 М розчин хлориду міді ($CuCl_2 \cdot 2H_2O$) – 27,28 г хлориду міді розчиняють у 600–700 мл води. Після розчинення солі об'єм розчину доводять до 1 л.

2. Розчиняють 64,5 г $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ у 500 мл дистильованої води, додають 7,2 г NaOH і доводять об'єм розчину до 1 л.

3. Боратний буфер з рН 8,9 – змішують 800 мл 0,05 N розчину бури ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) та 200 мл 0,05 N розчину соляної кислоти (HCl).

Для приготування зависі фосфорнокислої міді змішують розчини 1 та 2 у співвідношенні 1 : 2 і додають 2 об'єми розчину 3. Суміш готують безпосередньо перед застосуванням.

Реактив № 5 (фероціанідний реактив). Готують 1 % розчин нітрату амонію та 1 % розчин фероціаніду калію (жовтої кров'яної солі, $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$). Перед застосуванням змішують обидва розчини у співвідношенні 1 : 1.

Реактив № 6 (стандартний розчин мідної солі). Розчиняють 0,6092 г $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ у 100 мл дистильованої води. 1 мл цього розчину містить 6,092 мг мідної солі (2,27 мг міді), які відповідають 1 мг амінного азоту.

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАТЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Які сполуки рослин визначаються з допомогою цього методу?
2. Дайте характеристику фотометричного методу визначення амінного азоту.
3. Які речовини заважають визначенню? Як позбутися їх?
4. Дайте характеристику методу побудови калібрувального графіка.
5. Як готується завись фосфорнокислої міді?

РОБОТА 8.14. ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ТРИПТОФАНУ У ВЕГЕТАТИВНИХ ОРГАНАХ РОСЛИН

Принцип методу. Метод оснований на здатності триптофану за взаємодії з азотною кислотою у присутності сірчаної кислоти утворювати продукт жовтого кольору. Інтенсивність забарвлення розчину вимірюють на фотоелектроколориметрі за синім світлофільтром, використовуючи кювету з оптичним шляхом 10 мм. Оптичну густину дослідного розчину порівнюють із контрольним розчином. Кількість триптофану визначають за допомогою калібрувального графіка.

Перебіг аналізу. Беруть 1 г свіжого рослинного матеріалу та розтирають його у ступці. Отриману масу з допомогою 10 мл дистильованої води переносять у конічну колбу на 100 мл. Далі в колбу доливають 40 мл сульфонітратної суміші, перемішують і нагрівають у киплячій водяній бані протягом 1 год. Під час нагрівання вміст колби періодично перемішують. Після нагрівання колбу виймають із бані, охолоджують і залишають на ніч у холодному місці (наприклад, нижня полицка холодильника). Наступного дня рідину фільтрують через паперовий фільтр (синя стрічка) у суху чисту мірчу колбу місткістю 50 мл. Об'єм фільтрату (якщо це необхідно) доводять контрольним розчином до 50 мл. Контрольний розчин готують, змішуючи воду та сульфонітратну суміш у співвідношенні 1 : 4 і нагріваючи її протягом 1 год у киплячій водяній бані. Розчин у колбі перемішують і вимірюють оптичну густину на фотоелектроколориметрі за синім світло-

фільтром, використовуючи кювети з оптичним шляхом 10 мм та порівнюючи з контрольним розчином.

Вміст триптофану обчислюють за формулою:

$$X = \frac{a \times V \times 100}{n},$$

де:

X – вміст триптофану у 100 г рослинного матеріалу, мг;

a – кількість триптофану, знайдена за калібрувальним графіком, мг/мл;

V – загальний об'єм екстракту, мл;

n – наважка рослинного матеріалу, г.

Побудова калібрувального графіка

Готують стандартний розчин триптофану. Для цього 50 мг триптофану розчиняють у 50 мл дистильованої води (1 мл цього розчину містить 1 мг триптофану). Далі беруть 8 колб місткістю 50 мл. У першу колбу наливають 0,5 мл, у другу – 1 мл, у третю – 2 мл, у четверту – 3 мл, у п'яту – 4 мл, у шосту – 5 мл, у сьому – 6 мл стандартного розчину, об'єм розчинів у колбах доводять до 10 мл, додаючи необхідний об'єм дистильованої води. У восьму колбу наливають 10 мл дистильованої води. Вміст колб ретельно перемішують і в кожен колбу додають по 40 мл сульфонітратної суміші і знову перемішують. Колби залишають стояти за кімнатної температури протягом 1–2 год. Далі вимірюють оптичну густину забарвлених у жовтий колір розчинів на фотоелектроколориметрі за синім світлофільтром, використовуючи кювети з оптичним шляхом 10 мм. Порівняння ведуть із контрольним розчином (вода та сульфонітратна суміш). За отриманими даними будують калібрувальний графік, відкладаючи на осі абсцис концентрацію триптофану (мг/мл), а на осі ординат – оптичну густину розчинів. Концентрація триптофану у колбах після додавання сульфонітратної суміші становить 0,01, 0,02, 0,04, 0,06, 0,10 та 0,12 мг/мл.

Обладнання

1) конічні колби місткістю 50 мл; 2) піпетки об'ємом 1, 5 та 10 мл; 3) ступка з товчачиком; 4) лійки скляні; 5) водяна баня; 6) електрична пічка; 7) мірчий циліндр об'ємом 250 мл; 8) паперові фільтри (синя стрічка); 9) фотоелектроколориметр.

Реактиви

1) сульфонітратна суміш; 2) триптофан.

Приготування реактивів

Реактив № 1 (сульфонітратна суміш). Беруть 895 мл дистильованої води, обережно додають 292,5 мл концентрованої HNO_3 та 812,5 мл концентрованої H_2SO_4 і перемішують.

РОБОТА 8.15. ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ТРИПТОФАНУ У НАСІННІ РІЗНИХ ВИДІВ РОСЛИН

Принцип методу. Триптофан у сильно кислому середовищі у присутності нітрату натрію вступає в реакцію з п-диметиламінобензальдегідом, утворюючи продукт, який має блакитне забарвлення. Оптична густина забарвленого розчину вимірюється на фотоелектроколориметрі за червоним світлофільтром, використовуючи кювети з довжиною оптичного шляху 10 мм. Як контрольний розчин використовується розчин триптофану.

Перебіг аналізу. Наважку свіжого борошна (0,2 г крохмалисто-білкового насіння: пшениця, жито тощо; 0,1 г олійно-білкового насіння: соняшник, соя, арахіс тощо) переносять у конічні колби місткістю 100 мл, рівномірно змочують 2 мл дистильованої води і додають 1 мл 25 % розчину КОН, який містить желатин. У разі утворення грудок суміш розмішують скляною паличкою (паличку, на яку осіли частки борошна, протирають тонким папером, який приміщують у колби). Колби закривають гумовими пробками і ставлять у термостат для гідролізу за температури 40 °С на 18–20 год (на ніч).

Наступного дня у колбу додають 0,5 мл 2,5 % п-диметиламінобензальдегіду у 10 % соляній кислоті, ретельно перемішують і колби ставлять у термостат із температурою 25 °С на 1,5 год. Після експозиції об'єм розчину синьо-блакитного кольору доводять дистильованою водою до 100 або 50 мл, розчин перемішують і фільтрують через паперовий фільтр у суху конічну колбу. Прозорий забарвлений фільтрат використовують для визначення оптичної густини на фотоелектроколориметрі за червоним світлофільтром у кюветах завтовшки 10 мм. Контрольний розчином слугує розчин триптофану.

Вміст триптофану обчислюють за формулою:

$$X = \frac{a \times V \times 100}{n},$$

де:

X – вміст триптофану у 100 г рослинного матеріалу, мг/г;

a – кількість триптофану, знайдена за калібрувальним графіком, мг/мл;

V – загальний об'єм екстракту, мл;

n – наважка рослинного матеріалу, г.

Побудова калібрувального графіка

Наважку 25 мг триптофану марки х. ч. розчиняють у 20 мл дистильованої води у мірчій колбі об'ємом 25 мл. Після розчинення триптофану до розчину додають 1 мл 0,1 N розчину КОН або NaOH і об'єм рідини доводять до 25 мл етиловим спиртом. У конічні колби місткістю 100 мл наливають 2 мл дистильованої води; 1 мл 25 % розчину КОН, що містить желатин; 0,5 мл 2,5 % розчину п-диметиламінобензальдегіду; 0,5 мл 1 % розчину нітрату натрію та 28 мл кон-

центрованої соляної кислоти (*треба чітко дотримуватися наведеної послідовності додавання реактивів!*). Далі у першу колбу наливають 0,1 мл, у другу – 0,2, у третю – 0,3, у четверту – 0,4, у п'яту – 0,5 мл стандартного розчину триптофану. Розчини для розвитку забарвлення ставлять на 1 год у термостат із температурою 25 °С. Далі об'єм розчинів доводять дистильованою водою до 100 мл, перемішують та фільтрують через паперовий фільтр у сухі чисті колби. Оптичну густину фільтратів, забарвлених у блакитний колір, визначають на фотоелектроколориметрі за червоним світлофільтром, використовуючи кювети з товщиною шару рідини 10 мм. Контрольним розчином слугує стандартний розчин триптофану. На основі отриманих даних будують калібрувальний графік, відкладаючи на осі абсцис концентрацію триптофану (мг/мл), а на осі ординат – оптичну густину розчинів.

Обладнання

1) мірчі колби об'ємом 25 мл; 2) ступка з товкачиком; 3) конічні колби місткістю 100 мл; 4) гумові пробки до колб; 5) термостат; 6) паперові фільтри (синя стрічка); 7) скляні палички; 8) фотоелектроколориметр.

Реактиви

1) п-диметиламінобензальдегід 2,5 % розчин у 10 % соляній кислоті (термін зберігання розчину у холодильнику – не більше двох тижнів); 2) нітрат натрію (NaNO_3) 1 % розчин; 3) харчовий желатин 4 % розчин у 25 % KOH ; 4) соляна кислота (HCl); 5) триптофан; 6) етанол.

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАТЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

(до робіт 8.14 та 8.15)

1. Яке значення має триптофан у життєдіяльності рослин?
2. Дайте характеристику методів визначення триптофану у вегетативних органах (робота 1.14) та у насінні (робота 1.15) рослин.
3. Як будується калібрувальний графік для визначення триптофану?
4. Як обчислюється вміст триптофану у рослинних тканинах?

РОБОТА 8.16. ВИЗНАЧЕННЯ ПРОЛІНУ ЗА БЕЙТЕСОМ

Принцип методу. Визначення вмісту проліну оснований на його здатності реагувати у кислому середовищі з нінгідрином, утворюючи забарвлений продукт. Оптичну густину отриманого розчину вимірюють на фотоелектроколориметрі.

Перебіг аналізу. Наважку рослинного матеріалу (до 1 г) гомогенізують у ступці, переносять у пробірки за допомогою 10 мл дистильованої води, нагрівають на киплячій бані 10 хв. Пробірки охолоджують, екстракт фільтрують через паперовий фільтр. Далі беруть 2 мл фільтрату, додають 2 мл концентрованої оц-

тової кислоти, 2 мл реактиву № 2, який готують перед самим дослідом. Суміш ретельно перемішують і нагрівають на киплячій бані протягом 1 год. Проба для порівняння – 2 мл дистильованої води, 2 мл оцтової кислоти, 2 мл реактиву № 2 (тобто всі реактиви без рослинного екстракту). Після цього пробірки охолоджують і визначають оптичну густину за 520 нм (зелений світлофільтр) у кюветах з оптичним шляхом 10 мм.

Обчислення кількості проліну проводять за формулою:

$$X = \frac{C \times V_1}{n \times V_2},$$

де:

X – вміст проліну у рослинному матеріалі, мг/г;

C – концентрація проліну, знайденого за калібрувальним графіком, мг/мл;

V_1 – загальний об'єм витяжки, мл;

V_2 – об'єм витяжки, взятий для визначення проліну, мл;

n – наважка рослинного матеріалу, г.

Побудова калібрувального графіка

Для побудови калібрувального графіка готують серію стандартних розчинів проліну з концентраціями 0,005–0,1 мг у 2 мл розчину. Далі до цих розчинів додають по 2 мл концентрованої оцтової кислоти та реактиву № 2. Після кип'ятіння протягом 1 год вимірюють оптичну густину розчинів за зеленим світлофільтром (520 нм). За отриманими результатами вимірів будують калібрувальний графік, відкладаючи на осі абсцис концентрації проліну, а на осі ординат – оптичну густину розчинів.

Обладнання

1) ступка з товкачиком; 2) пробірки; 3) піпетки об'ємом 2 та 10 мл; 4) електрична плита; 5) паперові фільтри (синя стрічка) та скляні лійки; 6) фотоелектроколориметр.

Реактиви

1) оцтова кислота (CH_3COOH) концентрована; 2) розчин нінгідрину.

Приготування реактивів

Реактив № 2 (розчин нінгідрину). 1,25 г нінгідрину розчиняють у суміші 30 мл концентрованої оцтової кислоти і 20 мл 6 М фосфорної кислоти, розчинення відбувається під час нагрівання. Реактив готують безпосередньо перед визначенням.

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Наведіть характеристику будови, функцій та значення проліну у рослинах.
2. Охарактеризуйте принцип методу визначення вмісту проліну у рослинах.

3. Як будується калібрувальний графік для визначення проліну?
4. Наведіть розрахунок концентрацій проліну, які відкладаються на осі абсцис.

РОБОТА 8.17. КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ВІЛЬНИХ АМІНОКИСЛОТ У РОСЛИННОМУ МАТЕРІАЛІ МЕТОДОМ ХРОМАТОГРАФІЇ НА ПАПЕРІ ЗА МЕТОДОМ К. В. ГІРІ ТА Ф. БОДЕ У МОДИФІКАЦІЇ Г. Н. ЗАЙЦЕВОЇ ТА Н. П. ТЮЛЕНЄВОЇ

Нині відомо більш ніж 300 амінокислот, які виділено з різних природних об'єктів. Окрім зв'язаних амінокислот, які складають молекули білка, у рослинних організмах знайдено різноманітні вільні амінокислоти.

Перебіг аналізу. Для екстракції вільних амінокислот беруть свіжий рослинний матеріал у кількості 1–2 г, подрібнюють, примішують у центрифугальні пробірки і заливають 96 % етанолом. Етанол беруть у такій кількості, щоб після змішування з водою, яка міститься у рослинній тканині, його концентрація становила 80 %. Для визначення кількості води в рослинному матеріалі його зразок висушують за температури 105 °С. Для кращої фіксації матеріалу треба нагріти вміст пробірки на водяній бані до закипання спирту. Далі зафіксований рослинний матеріал переносять у фарфорову ступку і розтирають до гомогенного стану. Розтерту масу знову переносять у центрифугальну пробірку і центрифугують за 3 000–4 000 об./хв протягом 5 хв. Надосадову рідину зливають у чисту конічну колбу, осад заливають 2–3 мл 80 % етанолу, перемішують скляною паличкою і знову центрифугують за 3 000–4 000 об./хв протягом 5 хв. Екстракцію етанолом повторюють 6–7 разів.

Екстракцію вільних амінокислот можна проводити на скляному фільтрі (фільтр Шотта) № 3, який з'єднано з колбою Бунзена. Проминання осаду на фільтрі ведуть 6–7 разів по 2–3 мл 80 % розчином етанолу.

Отриманий екстракт для очистки від ліпідів і білків переносять у ділильну лійку, доливають 3 об'єми хлороформу та 0,5 об'єму води. Суміш у ділильній лійці перемішують і дають відстоятися протягом декількох годин (можна залишити до наступного дня), щоб відбулося повне розділення шарів і вони стали прозорими. Після відстоювання нижній хлороформовий шар зливають, а верхній шар, який містить амінокислоти, кількісно переносять у випарну чашку і випарюють на киплячій водяній бані. Під час випарювання необхідно стежити, щоб сухі чашки довго не знаходилися на киплячій водяній бані. Сухий залишок, який отримано після випарювання, розчиняють у невеликому об'ємі (0,5–1 мл) 10 % ізопропанолу. Цей розчин використовують для нанесення на хроматограми.

Нанесення розчину амінокислот на хроматограми

Під час нанесення амінокислот на хроматограми необхідно дотримуватися таких правил:

1. Розчин амінокислот на хроматограму наноситься у вигляді плям, діаметр яких не повинен перевищувати 2–3 мм. Якщо на хроматограму наносяться порівняно великі кількості розчину, то вони наносяться у вигляді смуг довжиною 10 мм та завширшки 2–3 мм. Від дотримання цього правила значною мірою залежить якість розділення амінокислот.

2. Для нанесення використовуються мікропіпетки з відтягнутим капілярним кінцем. Для якісного нанесення плям розчин із мікропіпетки за умови її нахиленого положення повинен витікати дуже повільно, залишаючи маленькі плями на папері. У горизонтальному положенні мікропіпетки розчин з неї не витікає. Нанесення ведеться методом багаторазового накрапування розчину з просушуванням паперу після кожного нанесення у потоці теплого повітря.

3. Хроматографічного паперу не можна торкатися руками для запобігання потрапляння на папір амінокислот, які містяться на шкірі пальців. Тому всю роботу з хроматографічним папером проводять у гумових рукавичках.

Легше за все дотриматися цих правил, використовуючи спеціальний стіл для нанесення хроматограм, у кришці якого є прямокутний отвір. Над цим отвором розташовується місце нанесення розчинів амінокислот. Під отвором розташовано вентилятор із нагрівачем (зручно використовувати електрорушник).

Розділення суміші амінокислот

Для хроматографічного розділення треба, щоб хроматограма знаходилася у атмосфері, яка насичена парами розчинника. Це досягається приміщенням хроматограми у герметично закриту камеру, на дно якої зливається надлишок розчинника.

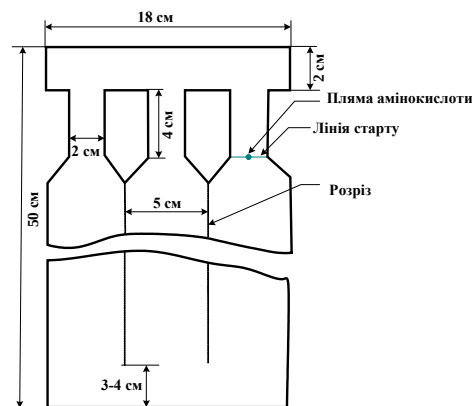


Рис. 35. Розмітка хроматографічного паперу

Для кращого розділення амінокислот хроматографічний папір розрізають на смуги завширшки 18 см та довжиною 50 см. Щоб розчини амінокислот не змішувалися, у хроматограмі роблять фігурні отвори (рис. 35) та розрізають аркуш на смужки завширшки 5 см. Лінія розрізу повинна бути коротшою, ніж довжина хроматограми, і не доходити до нижнього краю на 3–4 см.

Після нанесення дослідного розчину та розчинів «свідків» (відомі амінокислоти) на хроматограму та її просушування вона приміщується у хроматографічну камеру. На дно камери наливається суміш розчинника (нижній шар) для насичення її парами розчинника. Як

розчинник використовується суміш н-бутанол – оцтова кислота – вода у співвідношенні 4 : 1 : 5. Ця суміш готується у ділильній лійці. Компоненти змішують у ділильній лійці і дають розділитися на два шари. Нижній шар використовують для насичення камери, а верхній шар виливають у ванночку. Із його допомогою відбувається розділення амінокислот. У ванночку занурюють верхній край хроматограми, камеру герметично закривають і проводять хроматографію. Процес закінчується, коли розчинник доходить майже до нижнього краю хроматограми (відстань розчинника від нижнього краю хроматограми повинна складати 3–4 см). Після цього хроматограма просушується і процес проходження розчинника папером повторюється з новим розчинником. Для якісного розділення амінокислот розчинник пропускають хроматограмою 4–5 разів. За умови використання як розчинника суміші н-бутанол – оцтова кислота – вода у співвідношенні 4 : 1 : 5 амінокислоти розташовуються у такій послідовності: цистин, лізин, аргінін, гістидин, аспарагінова кислота + серин + гліцин (ці три кислоти мають вигляд тісно зближених плям), глутамінова кислота + треонін (також тісно зближені), аланін, пролін (жовтого кольору), валін, метіонін, триптофан, фенілаланін, лейцин + ізолейцин. Для розділення аспарагінової кислоти, серину та гліцину, а також відокремлення глутамінової кислоти від треоніну та метіоніну від валіну можна застосувати суміш н-бутанолу, оцтової кислоти та води у співвідношенні 40 : 15 : 5. Ця суміш після змішування не поділяється і може відразу бути використана для розділення амінокислот. На розділення вільних амінокислот на хроматограмі сильно впливає температура. За температури вище 25 °C розділення відбувається погано.

Для ідентифікації амінокислот, які містяться у дослідному зразку, на хроматограми наносять «свідки» – суміш відомих амінокислот та окремі амінокислоти.

Кількісне визначення

Після розділення хроматограми просушуються у витяжній шафі протягом доби. Просушені хроматограми обробляють 0,5 % розчином нінгідрину у ацетоні, який містить 1 % оцтової кислоти. Хроматограми провітрюють 5–10 хв у витяжній шафі за кімнатної температури для видалення з них ацетону (*на хроматограми не повинні потрапляти прямі сонячні промені*). Далі хроматограму нагрівають у термостаті за температури 60 °C протягом 30 хв. Проявлені плями амінокислот обводять простим олівцем і вирізають ножицями. Вирізані плями розрізають у вигляді дрібних смужок і приміщують у пробірки для елюації комплексу амінокислот з нінгідрином. Для елюації в кожну пробірку додають 5 мл 0,005% розчин сульфату міді у 75 % у етанолі, пробірки закривають гумовими пробками і періодично струшують протягом 1,5–2 год. Одночасно з плямами амінокислот вирізають чисті ділянки хроматограми і проводять їх елюацію (контрольний розчин). Забарвлені розчини колориметрують на фотоелектроколориметрі за зеленим світлофільтром проти контрольного елюату з паперу, викори-

стовуючи кювети завтовшки 5 або 10 мм. Для кількісного визначення амінокислот у рослинному матеріалі використовують калібрувальні графіки, які будуються для кожної амінокислоти окремо, після їх хроматографування.

Побудова калібрувального графіка

Для побудови калібрувального графіка готують 0,002 М розчин амінокислот. Для цього на аналітичних терезах зважують відповідні наважки амінокислот і розчиняють їх у 10 мл 10 % ізопропанолу, який розчиняється у 0,06 N HCl. Для наближення умов побудови калібрувального графіка до умов аналізу дослідної проби розчиняють декілька амінокислот у одному об'ємі (10 мл) ізоамілового або ізопропілового спирту. Для побудови калібрувальних графіків на хроматограми наносять 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 та 80 мкл стандартних розчинів амінокислот. Хроматограми приміщують у хроматографічні камери та пропускають через них розчинник (н-бутанол–оцтова кислота–вода 4 : 5 : 1) стільки разів, скільки разів його пропускали через дослідні хроматограми. Далі хроматограми просушують та проявляють розчином нінгідрину. Плями, що утворилися після проявлення, вирізають, комплекс амінокислот з нінгідрином елюють розчином сульфату міді. Оптичну густину елюатів вимірюють на фотоелектроколориметрі за зеленим світлофільтром у кюветах з довжиною оптичного шляху 5 або 10 мм. За отриманими даними будують калібрувальні графіки окремо для кожної амінокислоти. На осі абсцис відкладають концентрації амінокислот, на осі ординат – оптичну густину.

Обладнання

1) хроматографічний папір марки «швидкий»; 2) хроматографічна камера; 3) мікропіпетки (12 шт.); 4) скляні палички; 5) ділильна лійка; 6) пробірки; 7) фарфорова ступка з товкачиком; 8) випарні чашки; 9) сушильна шафа; 10) центрифуга та центрифугальні пробірки; 11) електроплитка; 12) хроматографічний стіл; 13) ножиці; 14) лінійка; 15) прості олівці; 16) мірчі циліндри; 17) піпетки об'ємом 5 та 10 мл; 18) конічні колби об'ємом 250 та 500 мл; 19) фотоелектроколориметр; 20) міліметровий папір.

Реактиви

1) етанол; 2) хлороформ; 3) ізопропанол; 4) розчини для елюації амінокислот; 5) соляна кислота; 6) оцтова кислота; 7) нінгідрин; 8) ацетон; 9) набір амінокислот.

Приготування реактивів

Реактив № 4 (розчин для елюації амінокислот). Беруть 50 мг сульфату міді ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) та розчиняють у 220 мл дистильованої води. Об'єм розчину доводять до 1 000 мл 96 % етанолом.

Реактив № 7 (розчин нінгідрину). Зважують 0,5 г перекристалізованого нінгідрину і розчиняють його у 70–80 мл ацетону. У розчин додають 1 г (1,05 мл) оцтової кислоти. Об'єм рідини доводять ацетоном до 100 мл.

Перекристалізація нінгідрину. Зважують 100 г нінгідрину, розчиняють у 500 мл 2 N соляної кислоти, додають 10 г активованого вугілля. Розчин з вугіллям нагрівають до кипіння і гарячий розчин фільтрують через скляний фільтр № 2 або № 3. Розчин залишають для перекристалізації на 4 год за кімнатної температури, а далі на ніч ставлять у холодильник. Кристали збирають на скляному фільтрі, промивають 50 мл 1 N соляної кислоти та висушують у вакуум-ексикаторі над КОН. Вихід чистого нінгідрину – 90–94 %, температура його плавлення – 241 °С.

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАТЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Які методи використовуються для якісного визначення амінокислот?
2. Дайте характеристику принципу методу хроматографії на папері.
3. Які умови необхідно виконувати, щоб розділення амінокислот на папері було якісним?
4. Яка різниця між вільними та зв'язаними амінокислотами?
5. Дайте характеристику рослинних амінокислот. Які амінокислоти входять до складу білка?
6. Як ідентифікуються амінокислоти на папері після хроматографування? Що таке «свідки»? Як ведеться проявлення хроматограми?
7. Як визначити кількісний вміст амінокислот у рослинному матеріалі з допомогою хроматографії на папері?
8. Які ще методи кількісного аналізу амінокислотного складу ви знаєте?

РОБОТА 8.18. ЕЛЕКТРОФОРЕЗ РОСЛИННИХ БІЛКІВ У ПОЛІАКРИЛАМІДНОМУ ГЕЛІ

Детальне вивчення білків необхідно для з'ясування структури функцій усіх тканин та клітин рослини і клітинних органоїдів для вирішення завдань фізіології рослин, генетики, практичної селекції, біохімічної систематики рослин. Особливий інтерес становлять методи, які дають можливість проведення на молекулярному рівні детального аналізу природних білкових систем або комплексів із рослинного матеріалу за короткий час за наявності нескладного обладнання. Таким вимогам відповідає один із нових фізико-хімічних методів аналізу білків – метод електрофорезу у синтетичному поліакриламідному гелі. Для успішного дослідження потрібно використовувати лише свіжі екстракти або нативні препарати білків з насіння, листя, коренів та інших органів рослин, які виділено у м'яких умовах, що забезпечують збереження природної структури білкових молекул та комплексів.

Підготовка матеріалу

Для дослідження білків методом електрофорезу найкращі результати можуть бути отримані для свіжих, живих тканин або органів рослини. Для виділення білків беруть свіжий рослинний матеріал кількістю 1–5 г, примішують у ступку та заморожують у морозильній камері холодильника. Далі рослинний матеріал розтирають до гомогенного стану у присутності трис-гліцинового буферного розчину з рН 8,3 (реактив № 1). Специфічне ускладнення під час аналізу білків із вегетативних органів рослин полягає у швидкому окисленні їх тирозинових залишків поліфенолоксидазою, яка потрапляє у екстракт із розтертої рослинної тканини. У такому разі для екстракції білків треба використовувати буферний розчин із захисними добавками (реактив № 2).

Свіжий рослинний матеріал заливають трис-гліциновим буфером у співвідношенні 1 : 2 або 1 : 3, тобто на кожний грам наважки беруть 2 або 3 мл буферного розчину. Отриманий гомогенат настоюють у холодильнику протягом 2–3 год, центрифугують 5 хв за 5 000 об./хв. Надосадову рідину зливають у пробірку, яку ставлять у холодильник. Отриманий розчин може зберігатися протягом декількох днів у холодильнику, але краще його використовувати для електрофорезу відразу після отримання.

Для електрофорезу використовують спеціальне обладнання. Апарат, який може бути використаний у роботі, виготовлений з органічного скла (рис. 36). Він складається з двох основних вузлів – внутрішньої та зовнішньої камер. Зовнішня

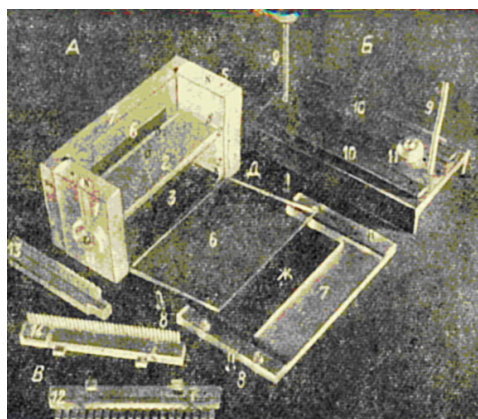


Рис. 36. Основні вузли апарата для електрофорезу у паралельних пластинах поліакриламідного гелю. А – внутрішня камера; Б – штатив для заливання гелю; В – штамп для формування лунок. Інші позначення – у тексті

камера слугує посудиною для буферного розчину (анодного) і є простою коробкою. У неї на двох підставках примішують внутрішню камеру, холодильні елементи та магнітик мішалки. Внутрішня камера (А) – головна частина приладу. У ній сполучено посудину для катодного буферного розчину (а) та дві паралельні скляні кювети б для гелю; на ній же кріпляться платинові електроди і клеми. До комплекту апарата входять також штатив для заливання гелю (Б), набір штампів (12, 13, 14), за допомогою яких формують лунки у гелі. Внутрішня камера збірна та складається із основи (1–

3) з електродами і клемми (4, 5), двох зйомних скляних стінок (6), двох при-

тискних планок (7) та восьми гвинтів (8). Основа в поздовжньому розрізі має Н-подібну форму. Вона являє собою дві масивні торцеві стінки, між якими в пази (6) уклеєно днище (2) катодної посудини. Знизу з боків у спеціальні пази (2) цієї основи уклеєно дві скляні пластинки, які утворюють внутрішні стінки (3) двох кювет для гелю.

Зйомними бічними стінками (6) для кювет і одночасно для катодної посудини служать дві скляні пластинки. Їх накладають із двох сторін основи на пази (4) торців і притискають до них планками (7), але лише по краях стекол. Шви герметизують смужками губчастої гуми, уклеєними в пази (6) планок, кожна з яких притискається до торців чотирма гвинтами. Притискні планки мають вікна (8) за розміром кювет для гелю. Через ці вікна відбувається вільне охолодження всієї поверхні скляних стінок. Круглі отвори у торцевих стінках забезпечують вільну циркуляцію буферного розчину у просторі між кюветами. Вертикальні канали у торцевих стінках служать для виходу газу з анода. Через них же проходять стійки (9) штатива під час заливання гелю.

Штатив для заливання гелю – це міцна пластина з вініпласту або текстоліту із двома смугами губчастої гуми (10), які герметизують кювети знизу. На стійки штатива нагвинчують накатні баранчики (11), якими камера притискається до гуми.

Штампи для формування лунок у гелях (12, 13 та 14) складаються з основи, формуючих зубів, двох ручок і двох регульованих гвинтових упорів. Вони різняться за числом, розташуванням та шириною зубців.

Гелі готують за обраним прописом зі стандартних розчинів. Системи гелів можуть бути однорідними за щільністю, із градієнтом або плівчастими. Для приготування гелю з двома шарами всі деталі апарата повинні бути ретельно вимиті теплим розчином детергенту та обполіскані дистильованою водою. Під час збирання внутрішньої камери нижні краї зйомних стінок потрібно розташувати в одній площині із краями внутрішніх стекол, планки рівномірно притискають гвинтами до упору у торці основи. Губчаста гума штатива перед установкою камери може бути змащена 40 % розчином сахарози. Надягнуту на стійки штатива камеру притискають до гуми загвинчуванням баранчиків, так що обидві кювети для гелю знизу герметизуються. У ліві нижні кути кювет приміщують етикетки з порядковим номером досліду.

Приготування гелю

Для приготування гелю обидві кювети на 2/3 заповнюють розчином поділяючого гелю та піпеткою обережно нашаровують воду. Після полімеризації гелю воду зливають і заповнюють вільний простір кювет концентруючим гелем. Потрібні штампи для формування лунок із відрегульованим строго за центром кювет положенням рядів зубів занурюють у гелевий розчин, притискаючи упори до

скляних стінок. Під час цього основи штампів лягають на дно катодної посудини. Після закінчення полімеризації концентруючого гелю штампи обережно виймають. Камеру знімають зі штатива та приміщують на підставки у зовнішню камеру з охолодженим буферним розчином; буферний розчин наливають і в катодну посудину.

*Розчини для приготування нижнього та верхнього лужних гелів
(концентрація 7,5 %; розділення за pH 9,5)*

Розчин № 1 (pH 8,4): 1 N розчин соляної кислоти (HCl) – 48 мл, трис-(оксиметил)-амінометан – 36,6 г, тетраметилетилендіамін – 0,46 г, дистильована вода – до 100 мл.

Розчин № 2: акриламід – 30 г, N,N-метилен-біс-акриламід – 0,8 г, $K_3[Fe(CN)_6]$ – 0,015 г, вода – до 100 мл.

Розчин № 3 (свіжоприготований): $(NH_4)_2S_2O_8$ – 0,14 г, вода – до 100 мл.

Розчин № 4 (pH 6,9): 1 M H_3PO_4 – 6,4 мл, трис-(оксиметил)-амінометан – 1,43 г.

Розчин № 5: акриламід – 2,5 г, N,N-етилен-біс-акриламід – 0,63 г, вода – до 25 мл.

Розчин № 6: рибофлавін – 0,001 г, вода – до 25 мл.

Розчин № 7 (pH 8,3): трис-(оксиметил)-амінометан – 6 г, глікокол (гліцин) – 28,8 г, вода – до 1 000 мл.

Із цих розчинів готуються робочі суміші, для чого змішуються відповідні розчини у таких об'ємних співвідношеннях:

Суміш для нижнього гелю (pH 8,9): 1 частина розчину № 1; 2 частини розчину № 2; 1 частина дистильованої води; 4 частини розчину № 3.

Суміш для нижнього гелю (pH 6,9): 1 частина розчину № 4; 2 частини розчину № 5; 1 частина розчину № 6; 4 частини дистильованої води.

Буфер для електродних посудин (pH 8,3): 100 мл розчину № 7, 900 мл дистильованої води. Використовувати тільки один раз.

Нанесення дослідного розчину білків

Дослідний розчин, або екстракт білків, вносять у кожну лунку за допомогою каліброваної піпетки Пастера або автоматичної мікропіпетки у такій кількості, щоб загальний вміст білка в екстракті, який внесений, дорівнював приблизно 0,1 мг (100 мкг). Для кращого розділення дослідний розчин змішують з 40 % розчином сахарози у співвідношенні 1 : 1 та додають 2–3 краплі розчину бромфенолового синього. Барвник мігрує попереду білків, що дає змогу спостерігати за процесом електрофорезу. Проби вносять під буферний розчин.

Техніка вертикального електрофорезу

Апарат установлюють на магнітній мішалці. У буфер зовнішньої камери занурюють чотири заморожені холодильні елементи (по два уздовж обох стінок

внутрішньої камери). Рівень буферного розчину в зовнішній камері доводять до рівня катодного буфера. Вмикають мішалку та приєднують апарат до джерела живлення (УДЖ-1). Електрофорез займає приблизно 2,5 год. Вимкнувши живлення, виливають катодний буфер.

Розділення білків можна проводити в лужному або кислому гелі, але у будь-якому разі білки повинні рухатися зверху вниз. У лужному гелі більшість білків буде рухатися до аноду, тому нижній електрод повинен бути позитивним (+), а верхній – негативним (-). Електрофорез проводять за температури буферного розчину 5–7 °С. Режим фракціонування варіюють залежно від досліджуваного матеріалу. До входження індикаторної фарби у поділяючий гель підтримують струм 80 мА за напруги 210 В. Далі підвищують струм до 180 мА за напруги 470 В. Електрофорез проходить нормально, якщо барвник рухається у вигляді вузької дуже чіткої зони. Процес закінчується, коли зона барвника буде знаходитися приблизно на 5 мм вище від нижнього краю гелю.

Обробка електрофореграм

Після закінчення електрофорезу джерело живлення вимикають, електрофоретичну камеру розбирають. Знявши бічні стекла, зрізують концентруючий гель та виймають із кювет пластини поділяючого гелю. За необхідності перед проявом вони можуть бути розрізані на дві-три частини тонким ніхромовим дротом. Пластини гелю примішують у кювети з розчином Кумасі G-250 діамантового блакитного (фірми Serva) для проявлення білкових електрофореграм. Проявлені електрофореграми фотографують та переглядають, а за необхідності сканують. Пластини гелю товщиною 2 мм можна висушити між двома шарами целофанової плівки. Це зручно для тривалого зберігання та радіографії.

Визначення ізоферментів пероксидази

Готують запасний розчин. Для цього розчиняють у 100 мл 7 % оцтової кислоти (CH_3COOH), 16 г ацетату натрію (CH_3COONa) та насичують розчин ЕДТА (трилон-Б) і фільтрують. Розчин зберігається у темній пляшці у холодильнику.

Для проявлення зон ізоферментів пероксидази готують інкубаційне середовище, яке складається з 9 мл запасного розчину, 1 мл 0,1 % розчину пероксиду водню (свіжоприготований) та декількох кристалів (10–20 мг, кристали повинні розчинитися) нітропрусиду натрію. Пластинки гелю заливають інкубаційним середовищем та занурюють у посудину з холодною водою з льодом. Через 5–10 хв зони, які мають пероксидазну активність, забарвлюються у блакитний колір. Інкубаційне середовище зливають, а гель промивають водою. Після цього підраховують кількість зон пероксидази та вимірюють їх відносну електрофоретичну рухомість (ВЕР). Для визначення ВЕР знаходять відношення довжини шляху, який пройшла зона ферменту, до довжини шляху барвника.

Визначення ізоферментів α -амілази

Присутність α -амілази в окремих зонах білків на електрофореграмі можна виявити за зникненням крохмалю, який було введено до складу гелю, в цих зонах. Робочий розчин для приготування нижнього гелю (у випадку лужного гелю) складається з 1 частини розчину № 1, 2 частин розчину № 2, 1 частини води та 4 частин розчину № 3, в якому замість води використовується 1 % розчин крохмалю.

Для проявлення зон з α -амілазною активністю готують такі реактиви:

1. 0,1 М ацетатний буфер з рН 5,6.
2. Розчин для забарвлення: 0,3 % розчин йоду в 3 % розчині йодистого калію (КІ). Перед використанням цей розчин розводять у 6 разів дистильованою водою.

Гель інкубують в ацетатному буфері за 37 °С протягом 30–60 хв. Далі буферний розчин зливають, промивають гелі дистильованою водою за заливають розчином йоду. Забарвлення крохмалю відбувається через 5–10 хв. Після цього розчин йоду зливають, гель заливають водою. Зони з α -амілазною активністю мають вигляд незабарвлених білих смуг на синьому фоні.

Проявлення електрофореграм на білок

Гель з розділеними білками спочатку фіксують 7 % розчином трихлороцтової кислоти (ТХО) протягом 20 хв. Далі тричі (по 10 хв кожного разу) миють гель від ТХО дистильованою водою і забарвлюють 0,2 % розчином Кумасі яскраво-блакитного G-250 або амідочорним 10В. Для розчинення барвників застосовується суміш етанолу, води та оцтової кислоти у співвідношенні 10:30:1. Надлишок барвника відмивають протягом декількох годин сумішшю етанолу води та оцтової кислоти (10:30:1). Проявлені електрофореграми у цьому розчині можна зберігати протягом багатьох місяців у щільно закритих посудинах. Цим розчином можна також розмочити та реставрувати сухі електрофореграми.

Проявлені електрофореграми фотографують під шаром розчинника.

Ідентифікація білків на електрофореграмах

Білкові компоненти та зони з ферментативною активністю порівнюють та характеризують на основі їх відносної електрофоретичної рухомості. Для цього положення кожної зони порівнюється з положенням зони барвника-індикатору. Відлік здійснюють з допомогою прозорої лінійки з точністю до 0,5 мм, починаючи від старту (верхнього краю дрібнопористого гелю і до середини відповідної зони білка. Відносну електрофоретичну рухомість (ВЕР) обчислюють за формулою:

$$VER = \frac{l_1}{l_2},$$

де:

I_1 – відстань від старту до середини зони білка, мм:

I_2 – відстань від старту до відмітки барвника, мм.

ВЕР виражають десятинним дробом. Ідентичними можуть бути визнані зони, ВЕР яких відрізняється не більш ніж на 2 %. Шлях барвника-індикатору на порівнюваних електрофореграмах повинен бути однаковим або відрізнятися не більше ніж на 2 мм.

Обладнання

1) терези з гирками; 2) ступка з товкачиком; 3) пробірки; 4) центрифуга та центрифугальні пробірки; 5) піпетки об'ємом 1, 5 та 10 мл; 6) мікропіпетки; 7) прилад для електрофорезу; 8) джерело живлення УДЖ-1 або подібне.

Реактиви

1) трис-гліциновий буфер; 2) трис-гліциновий буфер із захисними добавками; 3) набір реактивів для електрофорезу; 4) пероксид водню (H_2O_2); 5) крохмаль 1 % розчин; 6) нітропрусид натрію; 7) оцтова кислота (CH_3COOH); 8) ацетат натрію (CH_3COONa); 9) йод; 10) йодистий калій; 11) кумасі яскраво-блакитний G-250; 12) амідю чорний 10В.

Приготування реактивів

Реактив № 1 (трис-гліциновий буфер). Трис-оксиметиламінометан – 1,2 г, глікокол – 5,78 г, вода до 1 л.

Реактив № 2 (трис-гліциновий буфер із захисними додатками). Аскорбінова кислота – 0,5 г, гідроксид натрію – 0,12 г, діетилдитіокарбамат натрію – 0,05 г, трилон Б – 0,1 г, трис-гліциновий буфер (реактив № 1) до 100 мл.

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАТЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Принцип методу електрофорезу.
2. Які властивості білка покладені в основу розділення білків у поліакриламідному гелі?
3. Як готуються нижній та верхній гелі, які їх властивості та призначення?
4. Які каталізатори застосовуються для приготування гелів?
5. Яке значення має електрофорез для біологічних досліджень?
6. Що таке відносна електрофоретична рухомість, як вона обчислюється?
7. Як проводиться електрофорез у поліакриламідному гелі?
8. Як ідентифікуються ізоферменти пероксидази та α -амілази?
9. Як проявляються зони білків на електрофореграмі?

9. АНАЛІЗ АКТИВНОСТІ ФЕРМЕНТІВ РОСЛИН

ОКСИДО-РЕДУКТАЗИ (КФ 1)

РОБОТА 9.1. ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ГВАЯКОЛ-ПЕРОКСИДАЗИ

Пероксидаза має велике значення у процесі дихання рослин. Найбільш поширеними субстратами, на які діє пероксидаза у тканинах рослин, є поліфеноли у вільному стані або у складі різних сполук (глікозиди, дубильні речовини) та ароматичні аміни. Окислення цих сполук здійснюється з допомогою пероксиду водню або органічних пероксидів, наприклад, пероксидів жирних кислот та каротину.

Принцип методу. Метод оснований на здатності гваяколу окислюватися пероксидом водню за активною участю пероксидази, яка міститься у рослинному матеріалі. Гваякол окислюється до тетрагваяколхінону, розчин забарвлюється у червоно-коричневий колір, інтенсивність якого вимірюють на фотоелектроколориметрі за довжини хвилі 440 нм.

Результати порівнюють із калібрувальним графіком, який будується для срібла. Відповідно до кількості срібла розраховують активність ферменту.

Перебіг аналізу. Беруть свіжий рослинний матеріал кількістю 0,5 г, подрібнюють і примішують у фарфорову ступку. Додають 2 мл 5 % розчину нітрату або хлориду кальцію і, якщо об'єкт досліджень має кислу реакцію, 0,05 г карбонату кальцію. Матеріал гомогенізують протягом 3 хв, додають ще 5 мл розчину солі кальцію, розтирають ще 1 хв, і отриману суспензію переносять у мірчу колбу або мірчий циліндр об'ємом 50 мл. Промивають ступку розчином солі кальцію, об'єднуючи промивний розчин із гомогенатом. Цим розчином об'єм гомогенату доводять до 50 мл. Вміст колби збовтують та залишають протягом 30 хв. Далі гомогенат фільтрують через паперовий фільтр у суху чисту колбу.

Із отриманого фільтрату беруть від 1 до 8 мл (залежно від активності ферменту), переносять у суху пробірку, додають дистильовану воду до 8 мл та 1 мл 0,3 % розчину гваяколу (дослід проводять у трикратному повторенні). Вміст пробірок перемішують і пробірки примішують у водяну баню з температурою 20 °С. Коли температура у пробірках установиться на рівні 20 °С, у кожную пробірку додають 1 мл 0,05 N розчину пероксиду водню та знову перемішують. Через 15 хв вимірюють оптичну густину розчину на фотоелектроколориметрі за 440 нм у кюветі товщиною 10 мм. Розчином для порівняння слугує дослідний фільтрат, якого взято стільки, як і в досліді, розведений водою до 10 мл. Результати порівнюють із калібрувальним графіком, який побудовано для срібла, і за відповідною кількістю срібла обчислюють активність пероксидази за формулою:

$$X = \frac{50 \times 10 \times 2,53 \times c}{15 \times a \times n} = \frac{84,3 \times c}{a \times n},$$

де:

X – активність пероксидази за температури 20 °C (у мкмоль гваяколу, окисленого протягом 1 хв за дії ферменту, який міститься у 1 г рослинного матеріалу), мкмоль/хв·г;

c – концентрація срібла, знайдена за калібрувальним графіком, мг/мл;

a – об'єм дослідного розчину, який взято для проведення реакції з гваяколом, мл;

n – наважка рослинного матеріалу, г;

50 – об'єм витяжки, яку отримано з наважки, мл;

10 – об'єм розчину, який колориметрується, мл;

15 – час дії ферменту, хв;

2,53 – кількість мікромолів гваяколу, яка окислюється протягом хвилини у присутності 1 мг срібла за 20 °C.

Побудова калібрувального графіка

Готують стандартний розчин нітрату срібла, який містить 0,5 мг срібла у 1 мл розчину. У першу пробірку наливають 1 мл, у другу – 2, у третю – 3, у четверту – 4, у п'яту – 5, у шосту – 6 мл стандартного розчину нітрату срібла. Після цього у кожену пробірку додають дистильованої води до 8 мл, 1 мл 0,3 % розчину гваяколу і перемішують. Пробірки занурюють у воду з температурою 20 °C і додають з проміжками в 1 хв по 1 мл 3 % розчину персульфату амонію. Вміст пробірок знову перемішують і витримують за температури 20 °C. Точно через 15 хв після додавання персульфату амонію вимірюють оптичну густину розчинів у кожній пробірці за 440 нм у кюветі з довжиною оптичного шляху 10 мм. Для контролю готують розчин, який складається з 8 мл дистильованої води, 1 мл 0,3 % розчину гваяколу та 1 мл 3 % розчину персульфату амонію.

На основі отриманих даних будують калібрувальний графік, відкладаючи на осі абсцис концентрацію срібла у мг/мл, а на осі ординат – оптичну густину розчинів.

Обладнання

1) ступка з товчачиком; 2) мірчі колби об'ємом 50 мл; 3) конічні колби об'ємом 100 мл; 4) паперові фільтри; 5) водяна баня; 6) електрична плита; 7) хімічні склянки об'ємом 250–500 мл; 8) пробірки; 9) піпетки об'ємом 1, 5 та 10 мл; 10) мірчі циліндри об'ємом 25 та 250 мл; 11) спектрофотометр або фотоелектроколориметр.

Реактиви

1) гваякол 1 % розчин; 2) пероксид водню 0,05 N розчин; 3) стандартний розчин нітрату срібла; 4) персульфат (надсірчаноокислий) амоній 3 % розчин.

Приготування реактивів

Реактив № 1 (0,3 % розчин гваяколу). Якщо гваякол знаходиться у твердому стані, його потрібно підігріти на водяній бані. Після цього піпеткою беруть 0,6 мл гваяколу, розчиняють його у 100 мл дистильованої води і після розчинення реактиву доводять об'єм розчину водою до 200 мл. Зберігають у темній пляшці.

Реактив № 2 (0,05 N розчин пероксиду водню). Беруть 0,5 мл 30 % розчину пероксиду водню і розводять дистильованою водою до 150 мл. Перевіряють концентрацію H_2O_2 , для чого беруть 5 мл розчину пероксиду, переносять у колбу для титрування, додають 5 мл 4 N сірчаної кислоти і титрують 0,05 N розчином перманганату калію до появи рожевого забарвлення, яке не зникає протягом 30 с. Повинно використовуватися 5 мл розчину перманганату. Якщо кількість розчину перманганату калію відхиляється від 5 мл, концентрацію пероксиду водню доводять до необхідної або додаючи 30 % розчин пероксиду, або розводячи його водою. Термін зберігання розчину пероксиду водню у щільно закритій темній пляшці – 2–3 дні.

Реактив № 3 (стандартний розчин нітрату срібла). Відбирають чисті нерозкладені кристали нітрату срібла (вони мають білий колір, темні кристали відкидають), зважують на аналітичних терезах 0,1968 г солі і розчиняють у дистильованій воді у мірчій колбі об'ємом 250 мл. Об'єм розчину доводять до 250 мл дистильованою водою. 1 мл розчину містить 0,5 мг срібла. Розчин зберігають у посудині з темного скла.

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Хімічна природа та будова пероксидази. До якої групи ферментів належить пероксидаза?
2. Які реакції каталізує пероксидаза в рослинах? Яке значення має фермент у життєдіяльності рослин?
3. Дайте характеристику методу визначення активності пероксидази за допомогою гваяколу.

РОБОТА 9.2. ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ БЕНЗИДИН-ПЕРОКСИДАЗИ

Принцип методу. Метод оснований на визначенні швидкості реакції окислення бензидину до утворення синього продукту певної концентрації, яка попередньо встановлюється на фотоелектроколориметрі.

Перебіг аналізу. Наважку рослинного матеріалу 200–500 мг (величина наважки залежить від активності ферменту) ретельно розтирають у фарфоровій ступці з водою або ацетатним буфером рН 4,7 і переносять у мірчу колбу об'ємом 50 мл. Об'єм витяжки доводять до 50 мл, струшують та настоюють протягом

10 хв. Далі витяжку фільтрують через паперовий фільтр або центрифугують за 4 000 об./хв. Для визначення активності ферменту краще брати таку наважку та таке розведення витяжки, щоб зміна забарвлення відбувалася за 20–50 с (підбирають експериментально).

Якщо в розпорядженні дослідника є двопроменевий колориметр (наприклад, ФЕК-М, ФЕК-56), то у 2 кварцові кювети з оптичним шляхом 2 см наливають 2 мл ферментної витяжки, 2 мл розчину бензидину та 2 мл дистильованої води. Вимірювання здійснюють на фотоелектроколориметрі за червоним світлофільтром. Спочатку встановлюють нульову точку, далі встановлюють показник поглинання світла в положення 0,125 або 0,250 (залежно від очікуваної активності). У ліву кювету наливають 2 мл дистильованої води, а у праву – 2 мл перексиду водню, використовуючи піпетку з широким отвором. Відразу включають секундомір і ведуть спостереження за стрілкою гальванометра. Як тільки стрілка дійде нульової відмітки, секундомір зупиняють. За знайденою швидкістю реакції обчислюють активність ферменту:

$$X = \frac{E \times a \times b \times v}{c \times t},$$

де:

X – активність ферменту, умовні одиниці;

E – поглинання світла (0,125 або 0,250);

a – відношення кількості рідини, яка береться для приготування витяжки (мл), до ваги сирової тканини (г);

b – ступінь додаткового розведення після центрифугування;

v – ступінь постійного розведення у кюветі під час проведення реакції;

c – товщина шару рідини в кюветі (2 см);

t – час реакції (у секундах).

За наявності однопроменевого колориметра (КФО, КФК-2 та подібні) беруть дві кювети завтовшки 2 см і встановлюють у тримач кювет колориметра. У кювету, яка знаходиться в першому гнізді (контроль), наливають 2 мл ферментної витяжки, 2 мл розчину бензидину та 4 мл дистильованої води. У другу кювету наливають 2 мл ферментної витяжки, 2 мл розчину бензидину та 2 мл дистильованої води. За контрольним розчином настроюють прилад на «0» і вводять у світловий потік дослідну кювету. У неї швидко додають 2 мл перексиду водню і вмикають секундомір. Відлік часу припиняють, коли стрілка вимірювача колориметра досягне відмітки 0,125 або 0,250 (залежно від активності ферменту). Для обчислення активності використовують наведену вище формулу.

Обладнання

1) фарфорова ступка з товчачиком; 2) мірчі колби об'ємом 50 мл; 3) центрифуга; 4) лійка; 5) паперові фільтри; 6) фотоелектроколориметр; 7) секундомір.

Реактиви

- 1) ацетатний буфер pH 4,7; 2) бензидин, розчин в ацетатному буфері;
- 3) пероксиду водню (H_2O_2) 3 % розчин.

Приготування реактивів

Реактив № 2 (розчин бензидину в ацетатному буфері). У мірчу колбу об'ємом 200 мл наливають приблизно 100 мл дистильованої води, додають 2,3 мл концентрованої оцтової кислоти та 184 мг бензидину марки ч. д. а. (*реактив, дуже чутливий до якості бензидину*). Колбу нагрівають у водяній бані за температури 60 °C до повного розчинення бензидину. У колбу додають 5,45 г ацетату натрію, охолоджують і доводять об'єм дистильованою водою до 200 мл.

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Хімічна природа та будова пероксидази. До якої групи ферментів належить пероксидаза?
2. Які реакції каталізує пероксидаза в рослинах? Яке значення має фермент у життєдіяльності рослин?
3. Дайте характеристику методу визначення активності пероксидази за методом А. Н. Бояркіна.
4. Порівняйте методи визначення активності пероксидази. Які речовини можуть заважати проведенню реакцій у методі?

РОБОТА 9.3. ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ПЕРОКСИДАЗИ В РОСЛИННОМУ МАТЕРІАЛІ (ЗА О. В. ФЕДОВИМ)

Принцип методу. Метод оснований на здатності пероксидази у присутності пероксиду водню окислювати о-діанізидин. Інтенсивність забарвлення отриманого продукту реакції визначають на фотоелектроколориметрі.

Перебіг аналізу. У пробірки на 10 мл вносять 0,1–0,5 мл розчину пероксидази (культуральна рідина, гомогенат міцелію, витяжка ферменту з рослинного матеріалу або розчин препарату), 3 мл о-діанізидинового реактиву, дистильовану воду до об'єму 4,8 мл, і останнім додають 0,2 мл 0,05 % розчину H_2O_2 . Усі розчини повинні мати температуру 20 °C. Пробірки з реакційною сумішшю ставлять на водяну баню (20 °C) та інкубують 5 хв. Реакцію припиняють, додаючи 50 % сірчану кислоту до загального об'єму 10 мл.

Інтенсивність забарвлення продукту окислення о-діанізидину пероксидом водню вимірюють на фотоелектроколориметрі за зеленим фільтром у кюветі з оптичним шляхом 10 мм проти стандартного розчину, що містить усі інгредієнти, які вносяться в такій послідовності: вода, сірчана кислота, фермент, H_2O_2 .

Одиниця активності пероксидази відповідає кількості ферменту, що каталізує перетворення 1 мкмоль H_2O_2 за одну хвилину за оптимальних умов. Розрахунки проводять за формулою:

$$X = \frac{E \times V_1}{E_1 \times K \times V_2 \times t} \times p,$$

де:

X – активність ферменту пероксидази, мкмоль/г·хв;

E – екстинкція;

V_1 – об'єм забарвленої проби, мл;

V_2 – об'єм внесеного розчину ферменту, мл;

E_1 – коефіцієнт мікромолярної екстинкції (0,0128);

K – коефіцієнт для перерахунку з мілілітрів у літри (1 000);

t – час інкубації (5 хв);

p – коефіцієнт розведення розчину ферменту.

Обладнання

- 1) мірчі піпетки на 1, 2, 5 і 10 мл; 2) фотоелектроколориметр; 3) секундомір;
- 4) термометр; 5) пробірки об'ємом 10 мл.

Реактиви

- 1) о-діанізидин ($C_{14}H_{16}N_2O_2$); 2) пероксид водню (H_2O_2) 0,05 % щойно при-
готований розчин; 3) розчин ферменту; 4) сірчана кислота (H_2SO_4) 0,05 % розчин.

Приготування реактивів

Реактив № 1 (о-діанізидин). 50 мл 0,4 М фосфатного буфера, рН 5,9; 2 мл 1 % спиртового розчину о-діанізидину і дистильована вода до 200 мл (реактив зберігають до 2 тижнів у посуді з темного скла на холоді).

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАТЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Хімічна природа та будова пероксидази. До якої групи ферментів належить пероксидаза?
2. Які реакції каталізує пероксидаза в рослинах? Яке значення має фермент у життєдіяльності рослин?
3. Охарактеризуйте принцип методу визначення активності ферменту.
4. Що є спільним, а що відмінним у наведених колориметричних методах визначення активності пероксидази?

РОБОТА 9.4. ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ПОЛІФЕНОЛОКСИДАЗИ (О-ДИФЕНОЛОКСИДАЗИ) ЙОДОМЕТРИЧНИМ МЕТОДОМ

Поліфенолоксидаза каталізує реакцію окислення дифенолів киснем повітря, наприклад, пірокатехін перетворюється на о-хінон. Оптимальне рН дії ферменту – приблизно 6,0. У поліфенолоксидази знайдено різну кількість ізоферментів. Так, наприклад, у гриба коренева губка їх 2, а у деяких вищих рослин – 6. Поліфенолоксидаза інактивується синильною кислотою та сірководнем.

Принцип методу. Поліфенолоксидаза окислює киснем повітря пірокатехін, який відновлюється аскорбіновою кислотою. Частка аскорбінової кислоти, яка залишилася після відновлення пірокатехіну, визначається титруванням йодатом калію.

Перебіг аналізу. Беруть 1 г свіжого рослинного матеріалу, розтирають у фарфоровій ступці з невеликою кількістю дистильованої води. Розтерту масу за допомогою води переносять у мірчу колбу або циліндр об'ємом 50 мл, доводять об'єм гомогенату до мітки і перемішують. Отриману завись збовтують та переносять 10 мл суспензії в колбу для титрування об'ємом 250 мл. У колбу додають 1 мл фосфатного буфера з рН 6,4, 5 мл 0,04 N розчину аскорбінової кислоти, перемішують і додають 5 мл 0,2 % розчину пірокатехіну. Одночасно вмикають секундомір і струшують розчин протягом 2 хв для надходження кисню повітря у суспензію.

Точно через 2 хв реакцію припиняють додаванням 5 мл розчину мета- або ортофосфornoї кислоти (необхідну кількість кислоти відміряють ще до початку досліду). Усі розчини, які використовуються у досліді, повинні мати температуру 20 °С. У процесі реакції частина аскорбінової кислоти буде окислена продуктами реакції. Залишок аскорбінової кислоти визначають титруванням 0,01 N розчином йодату калію у присутності 1 мл 0,5 % розчину крохмалю до появи синього забарвлення, яке не зникає.

Одночасно проводять контрольне титрування. Для цього в колбу набирають 10 мл суспензії рослинного матеріалу, 5 мл фосфornoї кислоти, 5 мл 0,04 N аскорбінової кислоти та титрують 0,01 N розчином KIO_3 у присутності крохмалю. Активність поліфенолоксидази обчислюють за формулою:

$$X = \frac{50 \times 5 \times (a - b)}{10 \times 2 \times n} = \frac{12,5 \times (a - b)}{n},$$

де:

X – активність поліфенолоксидази (мкМ окисленої за 1 хв за 20 °С аскорбінової кислоти 1 г рослинної тканини);

a – об'єм розчину KIO_3 , який витрачено на титрування контрольного зразка, мл;

b – об'єм розчину KIO_3 , який витрачено на титрування дослідного зразка, мл;

n – наважка рослинної тканини, г;

50 – загальний об'єм витяжки, яку отримано з рослинної тканини, мл;

10 – об'єм витяжки ферменту, який взято для визначення активності ферменту, мл;

5 – коефіцієнт для перерахунку 0,01 N розчину аскорбінової кислоти у мкМ;

2 – час проведення реакції, хв.

Обладнання

1) фарфорова ступка з товчачиком; 2) мірчі колби об'ємом 50 мл; 3) мірчі циліндри об'ємом 25 мл; 4) піпетки об'ємом 2, 5 та 10 мл; 5) бюретки для титрування; 6) хімічні склянки об'ємом 250–500 мл.

Реактиви

1) пірокатехін ($C_6H_6O_2$) 0,2 % розчин; 2) йодат калію (KIO_3) 0,01 N розчин; 3) буферний розчин рН 6,4; 4) аскорбінова кислота ($C_6H_8O_6$) 0,04 N розчин; 5) мета- або ортофосфорна (HPO_3 або H_3PO_4) кислота 5 % розчин.

Приготування реактивів

Реактив № 2 (0,01 N розчин йодату калію). Зважують на аналітичних терезах KIO_3 , розчиняють його в дистильованій воді у мірчій колбі об'ємом 1 л, додають 5 мл 1 N розчину гідроксиду натрію та 2 г KI, перемішують до повного розчинення реактивів і доводять об'єм рідини до 1 л. Розчин зберігається у пляшці з темного скла.

Реактив № 3 (буферний розчин з рН 6,4). Наважку 5,44 г солі KH_2PO_4 розчиняють у дистильованій воді, додають 10 мл 1 N розчину гідроксиду натрію. Об'єм розчину доводять дистильованою водою до 200 мл. Зберігають у щільно закритій пляшці.

Реактив № 4 (0,04 N розчин аскорбінової кислоти). 0,35 г аскорбінової кислоти розчиняють у дистильованій воді і об'єм розчину доводять водою до 100 мл. Розчин зберігається протягом 1 дня.

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАТЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Наведіть характеристику хімічної будови поліфенолоксидази. До якої групи належить цей фермент?
2. Які реакції каталізує поліфенолоксидаза в рослинах? Яке значення цей фермент має в життєдіяльності рослин?
3. Дайте характеристику методу визначення активності поліфенолоксидази за допомогою методу титрування.

РОБОТА 9.5. КОЛОРИМЕТРИЧНИЙ МЕТОД ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ПОЛІФЕНОЛОКСИДАЗИ

Принцип методу. Метод оснований на здатності поліфенолоксидази окислювати поліфеноли до хінонів, які реагують із пірокатехіном. Внаслідок реакції утворюється окислений пірокатехін, забарвлений у коричневий колір. Для визначення активності ферменту вимірюється час окислення поліфенолів.

Перебіг аналізу. Наважку рослинного матеріалу 0,5 або $1 \pm 0,001$ г ретельно подрібнюють у фарфоровій ступці у присутності буфера з рН 7,4, переносять у

мірчу колбу об'ємом 50 мл і доводять об'єм витяжки до 50 мл буферним розчином. Визначення активності можна проводити безпосередньо у залежності рослинної тканини, але краще визначати активність ферменту після центрифугування або фільтрування витяжки. У дві кварцові кювети фотоелектроколориметра наливають компоненти реакційної суміші у такій послідовності: 2 мл витяжки, 2 мл дистильованої води, 2 мл розчину диметил-н-парафенілендіаміну. Якщо використовують двопроменевий колориметр, кювети установлюють у фотоелектроколориметр і настроюють його на нульову відмітку, використовуючи оранжевий або червоний світлофільтр. Далі коефіцієнт поглинання світла встановлюють на мітку 0,125, у контрольну (ліву) кювету додають 2 мл 0,01 N розчину щавлевої кислоти, а у дослідну (праву) кювету – 2 мл розчину пірокатехіну у 0,01 N щавлевій кислоті. Відразу вмикають секундомір. Коли стрілка вимірювального приладу колориметра досягне нульової відмітки, секундомір вимикають і записують час проходження реакції. Активність поліфенолоксидази обчислюють в умовних одиницях за формулою:

$$X = \frac{E \times a \times b \times v}{c \times t},$$

де:

X – активність ферменту, умовні одиниці;

E – поглинання світла (0,125 або 0,250);

a – відношення кількості рідини, яка береться для приготування витяжки, (мл) до ваги сирової тканини (г);

b – ступінь додаткового розведення після центрифугування або фільтрування;

v – ступінь постійного розведення у кюветі під час проведення реакції (4);

c – товщина шару рідини у кюветі (2 см);

t – час реакції (у секундах).

Якщо використовують однопроменевий колориметр, у контрольну пробірку відразу додають 2 мл 0,01 N розчину щавлевої кислоти та настроюють прилад на «0». У світловий потік вводять дослідну кювету і швидко додають 2 мл розчину пірокатехіну. Відразу вмикають секундомір. Відлік часу припиняють під час досягнення стрілкою гальванометра відмітки 0,125 або 0,250.

Обладнання

1) фарфорова ступка з товкачиком; 2) мірча колба об'ємом 50 мл; 3) піпетки об'ємом 2, 5 та 10 мл; 4) водяна баня; 5) фотоелектроколориметр.

Реактиви

1) диметил-н-парафенілендіамін ($(\text{CH}_3)_2\text{NC}_6\text{H}_4\text{NH}_2$) або парафенілендіамін ($\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2$) 0,02 % розчин у 0,01 N щавлевій кислоті; 2) щавлева кислота ($\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$) 0,01 N розчин; 3) пірокатехін ($\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_2$) 1 % розчин; 4) фосфатний буфер pH 7,4.

Приготування реактивів

Реактив № 1 (може використовуватися розчин диметил-н-парафенілендіаміну у воді). 0,02 г (20 мг) розчиняють у 100 мл дистильованої води; або розчин парафенілендіаміну у 0,01 N щавлевої кислоти; 0,02 г (20 мг) парафенілендіаміну розчиняють у 100 мл 0,01 N розчину щавлевої кислоти.

Реактив № 3 (1 % розчин пірокатехіну). 1 г пірокатехіну розчиняють у 100 мл 0,01 N розчину щавлевої кислоти.

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАТЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Наведіть характеристику хімічної будови поліфенолоксидази. До якої групи належить цей фермент?
2. Які реакції каталізує поліфенолоксидаза в рослинах? Яке значення цей фермент має в життєдіяльності рослин?
3. Дайте характеристику методу визначення + поліфенолоксидази колориметричним методом.
4. Порівняйте наведені методи визначення активності поліфенолоксидази.

РОБОТА 9.6. ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ КАТАЛАЗИ

Каталаза каталізує руйнування пероксиду водню на воду та молекулярний кисень. Вона має високу специфічність і нестійка в кислому середовищі. Для уникнення руйнування каталази рослинні препарати потрібно зберігати за температури нижче 10 °C протягом не більше 1 год.

Принцип методу. Метод оснований на визначенні залишку пероксиду водню після інкубації ферменту. Залишок пероксиду водню визначається за допомогою йодометричного титрування.

Перебіг аналізу. Наважку рослинної тканини (1 г листя та стебел, 2 г коренів цукрового буряка) приміщують у фарфорову ступку, додають 2 мл дистильованої води, а у випадку, коли клітинний сік має кислу реакцію, 2 мл фосфатного буфера з pH 7 або 0,2 г карбонату кальцію (CaCO_3) і ретельно розтирають. Вміст ступки переносять у мірчу колбу об'ємом 100 мл, змиваючи його водою. Об'єм витяжки у колбі доводять до 100 мл. Отриману завись енергійно збовтують і, не даючи відстоятися, набирають піпеткою три проби по 10 мл у великі пробірки. У пробірках витяжку розводять дистильованою водою до 20 мл. Температуру вмісту пробірок доводять до 20 °C у водяній бані і після цього додають 5 мл 0,1 N розчину пероксиду водню. Точно через 5 хв після додавання пероксиду водню реакцію припиняють, додаючи 5 мл сірчаної кислоти (1 : 9). Залишок пероксиду водню титрують. Для цього у суміш додають 1 мл 20 % розчину йодиду калію, 3 краплі 10 % розчину молібдату амонію або натрію як каталізатор. Вміст пробірок переносять у колби для титрування і титрують йод, який утворився,

0,02 N розчином тіосульфату натрію у присутності 1 мл 0,5 % крохмалю до зникнення синього забарвлення рідини. Паралельно титрують контрольну пробу. Для цього беруть 10 мл суспензії, додають 5 мл сірчаної кислоти і перемішують. Далі в колбу доливають 10 мл дистильованої води, 5 мл 0,1 N розчину перексиду водню, 1 мл 20 % розчину йодистого калію, 3 краплі молібдату амонію або натрію та 1 мл 0,5 % розчину крохмалю. Суміш ретельно перемішують і титрують 0,02 N розчином тіосульфату натрію. Активність ферменту обчислюють за формулою:

$$X = \frac{100 \times 10 \times (a - b)}{10 \times 5 \times n} = \frac{20 \times (a - b)}{n},$$

де:

X – активність каталази, млМ H_2O_2 , яка розкладається 1 г дослідної речовини протягом 1 хв;

a – об'єм 0,02 N розчину тіосульфату натрію, витраченого на титрування контрольної проби, мл;

b – об'єм 0,02 N розчину тіосульфату натрію, витраченого на титрування дослідної проби, мл;

n – наважка рослинного матеріалу, г;

10 (у чисельнику) – коефіцієнт перерахунку мілілітрів розчину тіосульфату натрію у мкМ H_2O_2 ;

100 – загальний об'єм витяжки, яку отримано з наважки рослинного матеріалу, мл;

10 (у знаменнику) – об'єм суспензії, який взято для визначення активності ферменту, мл;

5 – час дії ферменту, хв.

Для визначення якості ферменту визначають його активність за двох температур, які різняться на 10 °С, наприклад, за 10 °С та 20 °С. За отриманими даними активності обчислюють якість ферменту за формулою:

$$\mu = 39203 \times \lg \frac{A_{max}}{A_{min}},$$

де:

μ – енергетичний коефіцієнт, г/кал;

A_{max} – активність ферменту за максимальної температури (наприклад, 20 °С);

A_{min} – активність ферменту за мінімальної температури (наприклад, 10 °С).

Чим менше значення коефіцієнта, тим кращою є якість ферменту.

Під час визначення активності ферменту в об'єктах, які містять велику кількість крохмалю, необхідно перед визначенням дати крохмалю осісти і для досліду брати розчин без осаду крохмалю. У такому разі індикатор (розчин крохмалю) під час титрування можна не додавати, його найчастіше достатньо в розчині ферменту.

Обладнання

1) фарфорова ступка з товкачиком; 2) мірчі колби об'ємом 100 мл; 3) скляні палички; 4) циліндри мірчі об'ємом 25 мл; 5) великі пробірки; 6) хімічні склянки; 7) електрична плита; 8) водяна баня; 9) термометр; 10) бюретки для титрування; 11) хімічний штатив із затиском.

Реактиви

1) тіосульфат натрію ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 0,02 N розчин (готується з фіксаналу); 2) фосфат калію однозаміщений (KH_2PO_3); 3) карбонат кальцію (CaCO_3); 4) пероксид водню (H_2O_2) 0,1 N розчин; 5) сірчана кислота (H_2SO_4), розведена дистильованою водою у співвідношенні 1 : 9 за об'ємом; 6) йодид калію (KI) 20 % розчин; 7) молібдату амонію ($(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$) 10 % розчин; 8) крохмаль 0,5 % розчин (індикатор).

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. До якої групи ферментів належить каталаза? Які реакції каталізує цей фермент?
2. Як здійснюється визначення активності каталази наведеним методом?
3. Для чого в реакційну суміш додають розчин сірчаної кислоти?
4. Яка залежність існує між кількістю розчину тіосульфату натрію, який використовується на титрування зразка, і активністю каталази?
5. Як визначити якість ферменту?

РОБОТА 9.7. СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНИЙ МЕТОД ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ КАТАЛАЗИ У МІКОЛОГІЧНОМУ МАТЕРІАЛІ ЗА О. В. ФЕДОВИМ

Принцип методу. Метод оснований на здатності пероксиду водню утворювати із солями молібдену стійкий забарвлений комплекс. Інтенсивність забарвлення визначається за допомогою спектрофотометра.

Перебіг аналізу. Для приготування міцеліального гомогенату розтирають у фарфоровій ступці з битим склом міцелії з дистильованою водою у співвідношенні: 1 г міцелію : 1 мл дистильованої води. Якщо маса міцелію дуже мала, то гомогенат розводять у потрібну кількість разів (у 2, 3 тощо). Гомогенат фільтрують через паперовий фільтр у заздалегідь підписану чисту суху пробірку.

Далі у чисту суху пробірку наливають 0,1 мл гомогенату або культурального фільтрату і додають 2 мл 0,03 % розчину пероксиду водню (розчин готують безпосередньо перед початком досліду). У контрольну пробу замість дослідного матеріалу вносять 0,1 мл дистильованої води. Через 10 хв реакцію зупиняють додаванням 1 мл 4 % розчину молібдату амонію.

У пробірці із гомогенатом і в контролі спостерігають утворення стійкого жовтуватого забарвлення. Інтенсивність забарвлення вимірюють на спектрофотометрі за довжини хвилі 410 нм. Як еталон для порівняння використовують дистильовану воду. Інтенсивність забарвлення вимірюють також у контрольному зразку (усі компоненти з дистильованою водою замість розчину ферменту). Активність каталази розраховують за формулою:

$$X = (E_k - E_{exp}) \times V \times t \times k \times p,$$

де:

X – активність ферменту, мкмоль/г·хв;

E_k і E_{exp} – екстинкція контрольної та дослідної проб;

V – об'єм внесеної проби (0,1 мл);

t – час інкубації, с (600 с тобто 10 хв);

k – коефіцієнт мілімолярної екстинкції пероксиду водню ($22,2 \cdot 10^3 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$);

p – коефіцієнт розведення (для культурального фільтрату та міцеліального гомогенату, приготованого за співвідношенням 1 : 1, коефіцієнт розведення дорівнює 1).

Метод також можна застосовувати і для визначення активності ферменту у витяжках з рослинного матеріалу з урахуванням того, що рослинні екстракти мають жовтувато-зеленуватий колір.

Обладнання

1) технохімічні терези; 2) фарфорова ступка з товчачиком; 3) градуйовані піпетки; 4) пробірки; 5) спектрофотометр.

Реактиви

1) молібдат амонію $((\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4)$ 4 % розчин; 2) пероксид водню (H_2O_2) 0,03 % розчин.

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. До якої групи ферментів належить каталаза? Які реакції каталізує цей фермент?
2. Як здійснюється визначення активності каталази наведеним методом?
3. Дайте характеристику принципу спектрофотометричного методу визначення активності каталази.
4. Що потрібно враховувати для аналізу активності каталази у рослинному матеріалі? Як позбутися похибки?
5. Порівняйте методи визначення активності каталази, наведені вище.

РОБОТА 9.8. ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ КАТАЛАЗИ

Каталаза ($\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O}_2$ -оксидоредуктаза, КФ 1.11.1.6) є тетрамерним гемвмісним ферментом, який розкладає H_2O_2 до молекулярного кисню та води за такою схемою:



У рослин каталаза локалізується переважно у пероксисомах та гліоксисомах. Проте у кукурудзи були виявлені три ізоформи каталази, локалізовані у пероксисомах та цитозолі (CAT1, CAT2), а також у мітохондріях (CAT3).

Принцип методу. Метод базується на визначенні швидкості реакції розкладання пероксиду водню каталазою. Зміну оптичного поглинання реєструють на спектрофотометрі за довжині хвилі 240 нм (УФ-область). Коефіцієнт молярного поглинання пероксиду водню за вказаної довжини хвилі становить $39,4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Перебіг аналізу. Для визначення активності каталази готують реакційну суміш, що складається з 2 мл фосфатного буфера (pH 7,0), 160 мл ЕДТА та 13,84 мл дистильованої води. У кювету для спектрофотометрії послідовно додають 1,86 мл реакційної суміші, 20 мкл витяжки ферменту та 20 мкл розчину пероксиду водню. Оптичну густину реєструвати протягом 70 с з інтервалом 5 с на спектрофотометрі за довжини хвилі 240 нм. Паралельно у витяжці ферменту визначають концентрацію білка за методом Бредфорда. Розрахувати питому активність каталази за формулою:

$$A = \frac{\Delta OD \times V_1}{\varepsilon \times V_2 \times C_{prot}} \times 1000,$$

де:

A – активність ферменту, од./мг білка;

ΔOD – зміна оптичного поглинання за 1 хв;

V_1 – об'єм проби, мл;

ε – коефіцієнт молярної екстинції;

V_2 – об'єм супернатанту, мл;

C_{prot} – концентрація білка в супернатанті (мг/мл).

За одну одиницю активності каталази приймають таку кількість ферменту, яка перетворює 1 мкмоль пероксиду водню за 1 хв в 1 мг білка.

Обладнання

1) спектрофотометр; 2) автоматичні мікропіпетки; 3) пробірки об'ємом 5 мл.

Реактиви

1) калій-фосфатний буфер 400 мМ pH 7,0; 2) етилендіамінтетрацтова кислота (ЕДТА) 50 Мм розчин; 3) пероксид водню 1 М розчин (концентрацію перевіряють спектрофотометричним методом).

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАЇ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. До якої групи ферментів належить каталаза? Які реакції каталізує цей фермент?
2. Охарактеризуйте принцип дії каталази. Чому в назві ферменту зазначено дві функції (оксидазна та редуктазна)?
3. Як здійснюється визначення активності каталази наведеним методом?
4. Порівняйте методи визначення активності каталази, наведені вище.

РОБОТА 9.9. ВИЗНАЧЕННЯ ЗАГАЛЬНОЇ ДЕГІДРОГЕНАЗНОЇ АКТИВНОСТІ (ЗА Т. ТУНБЕРГОМ)

Принцип методу. Дегідрогенази клітини окислюють різні субстрати шляхом відщеплення водню та передачі його на коферменти дегідрогеназ (піридинові або флавінові). Активність дегідрогеназ у рослинних тканинах оцінюють шляхом визначення швидкості відновлення штучних редокс-агентів, загальною властивістю яких є здатність приймати електрони від відновлених коферментів дегідрогеназ. Як такі агенти можуть бути використані, наприклад, 2,6-дихлорфеноліндофенол, тетразолій блакитний, які змінюють колір під час відновлення. Швидкість відновлення барвників можна оцінити візуально або спектрофотометрично.

Перебіг аналізу. Наважку зародків (100–200 мг) і сім'ядолей (300–500 мг) розтирають у ступці з 1 мл розчину K_2HPO_4 . Розтерту масу кількісно переносять у трубку Тунберга, двічі ополіскуючи ступку, кожного разу доливаючи по 1 мл розчину K_2HPO_4 . Кінцевий об'єм гомогенату довести до 3 мл.

У розширену частину пробки трубки Тунберга вносять 1 мл розчину 2,6-дихлорфеноліндофеноляту натрію концентрацією $5 \cdot 10^{-4}$ М. Змащують шліф вакуумним мастилом, вставляють у пробірку і добре притирають шліфи, повертаючи пробку з невеликою амплітудою. Пришліфовані поверхні мають бути прозорими. Суміщають отвір пробірки та пробки і за допомогою вакуумного насоса викачують повітря протягом 2–3 хв. Не відключаючи насос, поворотом пробки треба закрити пробірку. Підготовлені в такий спосіб пробірки приміщують на водяну баню за температури 37 °С. Після 15-хвилинної експозиції фарбу із головки корка доливають до вмісту пробірки, акуратно струшуючи її для перемішування реакційної суміші. Відзначити час початку експерименту. Пробірку залишають у термостатній бані та періодично струшують, слідкуючи за знебарвленням реакційної суміші. Відзначають час від моменту введення фарби до повного знебарвлення суміші, що відображає активність дегідрогеназ у пробі. Загальну активність дегідрогеназ обчислюють за формулою:

$$A = \frac{100}{t \times n},$$

де:

A – відносна активність (на 1 г маси сирової речовини за 1 хв);

t – час знебарвлення, хв;

n – наважка, г.

Обладнання

1) терези лабораторні; 2) фарфорова ступка з товкачиком; 3) трубка Тунберга; 4) піпетки об'ємом 2 та 5 мл; 5) вакуумний насос; 6) термостатна водяна баня; 7) секундомір.

Реактиви

1) фосфат калію двозаміщений (K_2HPO_4) 50 мМ розчин; 2) 2,6-дихлорфеноліндофеноляту натрію $5 \cdot 10^{-4}$ М розчин.

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Який механізм дії анаеробних і аеробних дегідрогеназ?
2. Як побудовані трубки Тунберга?
3. Яким основним вимогам вони повинні відповідати?
4. Де частіше всього застосовують трубки Тунберга?
5. Назвіть одиниці, в яких одержують інформацію під час користування трубками Тунберга.

РОБОТА 9.10. МІКРОМЕТОД ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ДЕГІДРОГЕНАЗ ЗА ДОПОМОГОЮ ВАКУУМ-ІНФІЛЬТРАЦІЇ (ЗА В. В. ПИЛЬНЕВИМ)

Принцип методу. В основу методу покладено властивість дегідрогеназ відновлювати безбарвні солі тетразолію з утворенням забарвленого формазану. Безбарвний 2,3,5-трифенілтетразолій приєднує водень і відновлюється до формазану червоного кольору. Формазан не розчиняється у воді, але добре розчиняється в ацетоні або ізопропіловому спирті. Мікрометодом можна визначити активність ферментів безпосередньо в живих рослинних тканинах. Він дає можливість виявити активність дегідрогеназ у безбарвних і забарвлених пігментами тканинах. Під час роботи треба відбирати однорідний матеріал і розрізати великі об'єкти на смужки завтовшки 1,5–2 мм.

Перебіг аналізу. Три наважки (30–100 мг) попередньо розрізаного на смужки рослинного матеріалу приміщують у маленькі бюкси. Дві наважки заливають 10 мл розчину трифенілтетразолію, виготовленого на буферній суміші. Третю (контрольну) занурюють у 10 мл чистої буферної суміші. Дослідний матеріал зверху обов'язково накривають скляними пробками. Бюкси приміщують у вакуум-ексикатор, з якого викачують повітря. Після припинення виділення пухир-

ців протягом 1–2 хв знову запускають повітря, під тиском якого розчин почне проникати у тканини. Бюкси закривають кришками та переносять на 30 хв у термостат, температура якого $+37^{\circ}\text{C}$, де тканини набудуть червоного забарвлення, інтенсивність якого залежить від активності дегідрогеназ. Далі кожну пробу виймають з бюкса та розтирають у ступці з невеликою кількістю ацетону або ізопропілового спирту. Уміст ступки переносять у мірчий циліндр і доводять об'єм до 5 або 10 мл, залежно від інтенсивності забарвлення (*залишки подрібненої тканини мають повністю знебарвитися*). Після розтирання всі проби центрифугують протягом 10 хв за 3 000 об./хв. Оптичну густину одержаного забарвленого формазаном екстракту одразу вимірюють на фотоелектроколориметрі або спектрофотометрі за довжини хвилі 460 нм або довжини хвилі 520 нм, якщо витяжка забарвлена у зелений колір (екстракти з листя).

Активність дегідрогеназ розраховують за різницею оптичної густини за показниками приладу для дослідних і контрольних проб. Цю різницю, виражену в цілих числах, називають «індексом активності» дегідрогеназ (її можна виражати в міліграмах формазану, якщо ввести розрахунки за калібрувальним графіком).

Обладнання

1) бюкси; 2) мірчі циліндри об'ємом 10 мл; 3) фарфорові ступки; 4) торсійні або аналітичні терези; 5) скляні пробки; 6) вакуум-ексикатор; 7) вакуумний насос; 8) термостат; 9) центрифуга; 10) спектрофотометр або фотоелектроколориметр.

Реактиви

1) буферна суміш Серенсена III з рН 7,17 1/15 М 2) 2,3,5-трифенілтетразолій хлористий, 0,25 або 0,5 % розчин, виготовлений на буферній суміші Серенсена III; 3) ацетон або ізопропіловий спирт.

Приготування реактивів

Реактив № 1 (буферна суміш Серенсена III). Для приготування в реактиву у 100 мл дистильованої води розчиняють 0,831 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ та 0,272 г KH_2PO_4 .

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Чому солі тетразолію є майже незамінними для визначення дегідрогеназної активності?
2. Які тканини рослини можуть характеризуватися високою дегідрогеназною активністю?
3. Чи можуть цитохроми бути акцепторами протона?
4. Назвіть механізм дії анаеробних та аеробних дегідрогеназ.

РОБОТА 9.11. ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗИ

Відкритий Дж. Мак-Кордом й І. Фрідовичем фермент супероксиддисмутаза (КФ 1.15.1.11) виконує у клітинах аеробних організмів унікальну функцію регуляції рівня супероксидних аніон-радикалів кисню O_2^- . Фермент складається з двох ідентичних субодиниць, кожна з яких має посеред ланцюга дисульфідний місток, одну сульфогідрильну групу та ацетильовану кінцеву аміногрупу. Місце, яке займає вода у ферменті, що знаходиться в активному стані, під час каталітичного циклу може бути зайняте супероксидним радикалом, киснем або гідроксильним радикалом. Супероксиддисмутази належить важлива роль у підтриманні певного рівня радикального окислення полієнових ацилів фосфоліпідів мембран – однієї з найважливіших умов клітинного гомеостазу. Останніми роками уявлення про біологічну роль супероксиддисмутази у клітині поширилися, поглибилися знання про механізми регуляції ферменту, з'явилися нові дані про його зв'язки з іншими біологічно активними сполуками та процесами. Роль вільних радикалів кисню у регуляції онтогенезу, а також їх участь у розвитку багатьох патологічних станів свідчать про важливість досліджень активності супероксиддисмутази як одного з показників неспецифічної резистентності організму до пошкоджуючих агентів різної етіології.

Супероксиддисмутаза – єдиний серед відомих антиоксидантних ферментів, який безпосередньо забезпечує обрив ланцюгів киснезалежних вільнорадикальних реакцій у клітинах аеробних організмів. Супероксиддисмутаза здійснює рекомбінацію радикалів кисню з утворенням пероксиду водню та триплетного кисню. Генерування радикалів пероксиду виникає за одноелектронного відновлення кисню ферментами у процесі транспорту електронів дихальним ланцюгом мітохондрій та редокс-системі ендоплазматичного ретикулума, а також за автоокислення різних внутрішньоклітинних компонентів: NAD(P)H, глутатіону, флавінів, цитохрому c, аскорбінової кислоти, адреналіну та ін. Аніон-радикал кисню може окислюватися та відновлюватися, перетворюватися у реакційноздатний синглетний кисень та гідроксильний радикал, який є ініціатором пероксидного окислення ліпідів (ПОЛ). Активність супероксиддисмутази пов'язана з інтенсивністю пероксидного окислення ліпідів та залежить від накопичення інтермедіатів ПОЛ. З одного боку, накопичення токсичних пероксидних продуктів (пероксидів жирних кислот, альдегідів, кетонів та інших продуктів) призводить до пригнічення активності супероксиддисмутази та інших антиоксидантних ферментів (каталази, глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази). З іншого боку, за принципом зворотного зв'язку зниження активності супероксиддисмутази, зумовленим впливом різних факторів, може спричинити збільшення складу пероксидів ліпідів, яке не завжди повертається до вихідного рівня, незважаючи на нормалізацію рівня супероксиддисмутази та антиоксидантів.

Перебіг аналізу. Активність супероксиддисмутази визначають за ступенем інгібування відновлення нітросинього тетразолію у присутності NADH та феназинметасульфату. До складу реакційної суміші входять 1,2 мл 0,15 М фосфатного буфера (pH 7,8), 0,1 мл 0,160 мМ розчину феназинметасульфату, 0,3 мл 0,610 мМ розчину нітросинього тетразолію, 0,2 мл 1 мМ розчину NADH. Супернатант додають до інкубаційної суміші в кількості 0,3 мл. Реакцію активують додаванням NADH і зупиняють через 1 хв додаванням 1 мл концентрованої оцтової кислоти. Інтенсивність забарвлення вимірюють за довжини хвилі 540 нм. Активність виражають в умовних одиницях на 1 г сирової маси за хвилину.

Обладнання

1) мірчі колби; 2) хімічні склянки; 3) пробірки; 4) піпетки; 5) лійка; 6) паперові фільтри; 7) бюкси; 8) спектрофотометр; 9) водяна баня; 10) термометр.

Реактиви

1) 0,15 М фосфатний буфер (pH 7,8); 2) феназинметасульфат (ФМС) 0,160 мМ розчин; 3) нітросиній тетразолі (НСТ) 0,610 мМ розчин; 4) нікотинамідаденіндинуклеотид (NADH) 1 мМ розчин; 5) оцтова кислота (CH_3COOH) концентрований розчин.

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАТЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Наведіть класифікацію ферменту супероксиддисмутази. До якого класу ферментів вона належить?
2. Наведіть значення цього ферменту для рослин. За яких умов активуються антиоксидантні системи рослин?
3. Охарактеризуйте принцип методу визначення активності супероксиддисмутази у рослинах.

РОБОТА 9.12. ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗИ ЗА ГІАННОПОЛІТИСОМ І РАЙСОМ

Принцип методу. Загальна активність супероксиддисмутази (СОД) визначається за здатністю ферменту інгібувати фотохімічне відновлення нітросинього тетразолію (NBT), згідно з Гіаннополітисом і Райсом (Giannopolitis, Ries, 1977) з деякими модифікаціями.

Перебіг аналізу. Наважку рослинної тканини масою 150–200 мг розтирають в охолодженій ступці з 300–400 мкл екстракційного буфера. Гомогенат центрифугувати протягом 5 хв за 12 000 g. Проби зберігаються у холодильнику за 4 °С.

Реакційна суміш містить: 0,5 мл 0,05 % розчину нітросинього тетразолію, 0,9 мл 50 мМ К,Na-фосфатного буфера (pH 7,8), 100 мкл екстракту та 20 мкл 0,24 % розчину Na-ЕДТА. Для кожного зразка використовують 2 однакові про-

бірки з реакційною сумішшю та екстрактом. Одну пробірку приміщують у темряву – темновий контроль, іншу виставляють на світло. До того ж готують контрольні пробірки без ферментативної витяжки для розрахунку максимальної інтенсивності забарвлення формагану. У ці пробірки замість екстракту вноситься 100 мкл K,Na-фосфатного буфера.

Реакція запускається додаванням 20 мкл 0,025 % рибофлавіну в усі пробірки. Вміст пробірок швидко перемішують. Темнові контролю приміщують у темне місце. Інші пробірки встановлюють під люмінесцентними лампами. Реакція триває 15 хв. Після закінчення часу реакцію зупиняють вимкненням світла. До визначення оптичної густини проби слід тримати у темряві. Оптичну густину вимірюють за довжини хвилі 560 нм.

За одиницю активності СОД приймають кількість ферменту, яка пригнічує реакцію відновлення нітросинього тетразоліу на 50 %. Спочатку обчислюється відповідність отриманої оптичної густини до одиниці активності. Для цього отримана оптична густина максимального утворення формагану ділиться на два і приймається за 50 % інгібування, або 0,5 одиниць:

$$a = \frac{D_{exp} \times 0,5}{D_{col} \div 2}.$$

Активність СОД розраховували за формулою:

$$A = \frac{a \times V \times X}{C \times L},$$

де:

A – активність ферменту;

a – відносна одиниця активності;

V – об'єм отриманої витяжки, мл;

X – кінцеве розведення витяжки в кюветі;

L – товщина шару розчину, мм;

C – кількість білка у наважці, мг.

Активність СОД виражають в умовних одиницях на 1 мг білка.

Для розрахунку активності СОД на один грам сухої маси кількість білка у наважці (**C**) замінюють на (**m×Δm**), де **m** – маса сирової наважки, **Δm** – відношення сухої ваги до сирової.

Розрахунок активності СОД також можна проводити за кількісним показником інгібування утворення формагану. Для цього використовують таку формулу:

$$F = \frac{\Delta D \times X}{7,2 \times C \times l'}$$

де:

F – кількість утвореного формагану, ммоль/мг білка;

ΔD – різниця оптичної густини максимальної концентрації формагану та оптичної густини зразка;

X – розведення у кюветі;

$7,2$ – коефіцієнт екстинкції формагану за довжини хвилі 560 нм, $\text{мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$;

C – вміст білка у пробі, мг;

l – довжина оптичного шляху, см.

Вимірювання активності супероксиддисмутази проводять у кількох (не менше трьох) біологічних та аналітичних повторюваннях.

Обладнання

1) фарфорові ступки з товчачиками; 2) пробірки; 3) мірчі піпетки; 4) спектрофотометр.

Реактиви

1) К,Na-фосфатний буфер (рН 7,8) 50 мМ; 2) екстракційний буфер; 3) рибофлавін 0,025 % розчин; 4) нітросиній тетразолій (NBT) 0,05 % розчин; 5) натрієва сіль етилендіамінтетраоцтової кислоти Na-ЕДТА 0,24 % розчин.

Приготування реактивів

Реактив № 1 (К,Na-фосфатний буфер). Готуються такі розчини:

1. 0,2 М KH_2PO_4 (1,36 г KH_2PO_4 розчиняють у дистильованій воді та доводять об'єм 50 мл),

2. 0,2 М NaOH (400 мг NaOH розчиняють у дистильованій воді та доводять об'єм розчину до 50 мл).

Для приготування 50 мМ К,Na-фосфатного буфера (рН 7,8) 25 мл розчину 1 змішують з 22,25 мл розчину 2 та доводять об'єм дистильованою водою до 100 мл. Перевіряють рН розчину і за потреби коригують значення концентрованою H_3PO_4 або 5 % NaOH.

Реактив № 2 (екстракційний буфер). 2 мл 50 мМ К,Na-фосфатного буфера (рН 7,8) додати 20 мкл фенілметилсульфонілфториду (ФМСФ).

Реактив № 3 (розчин рибофлавіну). 2,5 мг рибофлавіну розчинити в 10 мл киплячої дистильованої води.

Реактив № 4 (розчин нітросинього тетразолію 0,05 %). 5 мг барвника розчинити у 10 мл дистильованої води.

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАТЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Наведіть класифікацію ферменту супероксиддисмутази. До якого класу ферментів вона належить?

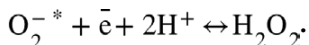
2. Наведіть значення цього ферменту для рослин. За яких умов активуються антиоксидантні системи рослин?

3. Охарактеризуйте принцип методу визначення активності супероксиддисмутази у рослинах.

4. Як готуються реактиви, необхідні для визначення супероксиддисмутази за допомогою цього методу?

РОБОТА 9.13. ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗИ З КВЕРЦЕТИНОМ

Супероксиддисмутаза (СОД, суперокси, супероксид-оксидоредуктаза, КФ 1.15.1.1) – фермент першої лінії антиоксидантного захисту, який каталізує реакцію перетворення супероксидного аніон-радикалу до пероксиду водню за такою схемою:



У рослин відомі три ізоформи СОД (Cu,Zn-вмісна, Mn-вмісна та Fe-вмісна). Найпоширеніша в клітинах рослин Cu,Zn-СОД, яка виявлена у хлоропластах, мітохондріях, пероксисомах та цитозолі. Mn-СОД наявна в матриксі мітохондрій і пероксисом, а Fe-СОД локалізована переважно у хлоропластах.

Клітини дріжджів продукують дві ізоформи СОД – Cu,Zn-вмісну і Mn-вмісну, які кодуються відповідно генами *SOD1* і *SOD2*. Cu,Zn-СОД локалізується переважно в цитозолі, але також була виявлена в ядрі та міжмембранному просторі мітохондрій. В аеробній культурі дріжджів Cu,Zn-СОД може репрезентувати до 90 % загальної активності ферменту.

Принцип методу. Цей метод дає змогу визначити сумарну активність СОД і ґрунтується на інгібуванні супероксиддисмутазою реакції окислення кверцетину. Середовище для визначення активності СОД містить ТЕМЕД (*N,N,N',N'*-тетраметилетилендіамін) – сполуку, яка у присутності кисню генерує супероксидний аніон-радикал. Під час додавання в цю суміш кверцетину останній окислюється, а швидкість реакції окислення реєструється на спектрофотометрі за довжини хвилі 406 нм. За одночасного додавання в суміш кверцетину і препарату СОД фермент конкурує з кверцетином за знешкодження супероксид аніон-радикалу, тому реакція окислення кверцетину сповільнюється. Зі збільшенням кількості препарату швидкість окислення зменшується. На основі визначень швидкості реакції за 6–8 різних кількостей препарату будується крива інгібування окислення кверцетину та розраховується константа половинного інгібування (*K₅₀*), яка дорівнює кількості мікролітрів препарату, за якої швидкість реакції окислення кверцетину зменшується наполовину від вихідної швидкості (без додавання препарату).

Перебіг аналізу. Для приготування супернатанту досліджуваний рослинний матеріал гомогенізують у співвідношенні 1 : 10 (на кожний г тканини беруть 10 мл середовища виділення) у середовищі виділення, яке складається з (вказано кінцеві концентрації) 50 мМ калій-фосфатного буфера (рН 7,0), 0,5 мМ ЕДТА та 1 мМ фенілметилсульфонілфториду (ФМСФ). Можна також отримувати супернатант з культури клітин. Для цього 10 мл вирощеної культури клітин (24 год росту) осаджують центрифугуванням за 3 тис. об./хв протягом 5 хв, промивають



Рис. 37. Пробірки Eppendorf

у 5 мл середовища виділення та ресуспензують у 0,8 мл цього середовища виділення. Переносять отриману суспензію клітин із центрифугальних пробірок у пробірки Eppendorf місткістю 2 мл, у які попередньо вносять по 0,4 мл скляних кульок діаметром 500–600 мкм виробництва «Sigma Co». Далі руйнують клітини шляхом вібрації зі скляними кульками на вортекс-міксері протягом 15 хв у такому режимі: 1 хв руйнування з наступною 1 хв охолодження на льоду (всього 7 циклів руйнування). Гомогенат центрифугують за 13 000 об./хв протягом 15 хв і температури 4 °С. Далі супернатант переносять у чисті пробірки Eppendorf. Проби зберігати на холоді.

Для визначення активності СОД готують реакційну суміш, склад якої наведений у табл. 5. Під час приготування суміші слід враховувати сумарний об'єм супернатанту та кверцетину (тобто відняти його від загального об'єму суміші під час обчислення кількості води) для отримання заданої кінцевої концентрації всіх компонентів суміші.

Таблиця 5. Склад реакційної суміші для визначення активності СОД

Компонент	Вихідна конц.	Кінцева конц.	Кількість компоненту, мл	
			на 1 мл	на 15 мл
Трис буфер (рН 10,0)	90 мМ	30 мМ	330 мкл	4,95 мл
ЕДТА	50 мМ	0,5 мМ	10 мкл	150 мкл
ТЕМЕД	320 мМ	0,8 мМ	2,5 мкл	37,5 мл
H ₂ O			537,5 мкл	13 мл

Для побудови кривої інгібування провести визначення швидкості реакції за 8 різних об'ємів супернатанту (табл. 6). Загальний об'єм проб становить 1,25 мл і містить: 1 100 мкл реакційної суміші, 125 мкл води + супернатант, та 25 мкл кверцетину (кінцева концентрація 0,05 мМ).

Зміну оптичної густини реєструють протягом 70 с на спектрофотометрі за довжини хвилі 406 нм та будують криву інгібування окислення кверцетину: по осі абсцис відкладається кількість препарату у мікролітрах, по осі ординат – зміну оптичної густини за хвилину. За графіком розраховується константа половинного інгібування (K_{50}).

Таблиця 6. Умови змішування компонентів для визначення кривої інгібування

Компонент	Об'єм компонентів, мкл							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Реакційна суміш	1 100	1 100	1 100	1 100	1 100	1 100	1 100	1 100
Вода + супернатант	125	123	120	117	115	110	105	95
Супернатант	0	2,5	5	7,5	10	15	20	30
Кверцетин	25	25	25	25	25	25	25	25

У супернатанті також визначається концентрація білка за методом Бредфорда.

Розрахувати специфічну активність СОД за формулою:

$$A = \frac{1}{K_{50} \times C_{prot}},$$

де:

A – активність, ум. од/мг білка;

K_{50} – константа половинного інгібування, мл;

C_{prot} – концентрація білка, мг/мл.

Специфічна активність показує, скільки одиниць активності знаходиться в 1 мг білка. Одна одиниця активності СОД відповідає кількості ферменту, який інгібує реакцію окислення кверцетину наполовину від максимального інгібування (тобто 1 одиниця активності СОД відповідає кількості ферменту, що міститься у K_{50} мкл препарату тканини).

Обладнання

1) гомогенізатор; 2) пробірки Ерпендорф об'ємом 2 мл; 3) мікропіпетки об'ємом 1 та 5 мл; 4) спектрофотометр.

Реактиви

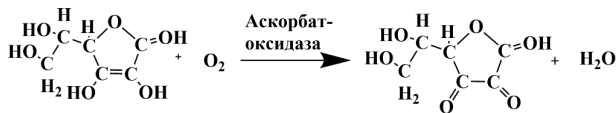
1) калій-фосфатний буфер (рН 7,0); 2) етилендіамінтетраоцтова кислота (ЕДТА); 3) фенілметилсульфонілфторид (ФМСФ); 4) трис-буфер (рН 10,0); 5) N,N,N,N-тетраметилетилендіамін (ТЕМЕД); 6) кверцетин (розчиняти в диметилформаміді).

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАТЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Наведіть класифікацію ферменту супероксиддисмутази. До якого класу ферментів вона належить?
2. Наведіть механізми каталізу реакції деактивації супероксидного радикалу з допомогою ферменту.
3. Охарактеризуйте принцип методу визначення активності супероксиддисмутази у рослинах.
4. Як обчислюється активність ферменту у цій роботі? У яких одиницях виражається активність супероксиддисмутази?

РОБОТА 9.14. ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ АСКОРБАТОКСИДАЗИ

Л-аскорбатоксидаза (КФ 1.10.3.3) – це фермент сімейства оксидоредуктаз. Цей фермент бере участь в обміні аскорбінової кислоти. Фермент як кофактор містить іон міді. Фермент каталізує хімічну реакцію за схемою:



Процеси окислення та відновлення аскорбінової кислоти мають велике значення у функціонуванні антиоксидантних систем рослинних клітин, які є системами захисту рослин від оксидативного стресу, який може бути викликаний несприятливими умовами довкілля (забруднення, посуха тощо).

Систематична назва цього ферменту L-аскорбат: оксидоредуктаза кисню. До інших загальноживаних назв належать аскорбаза, оксидаза аскорбінової кислоти, аскорбатоксидаза, аскорбінова оксидаза, аскорбатдегідрогеназа, L-аскорбінова кислота оксидаза, ААО, L-аскорбат: O₂ оксидоредуктаза та АА оксидаза.

Принцип методу. Метод оснований на визначенні зменшення концентрації аскорбінової кислоти у реакційній суміші. Концентрація аскорбату вимірюється за допомогою спектрофотометра в ультрафіолетовій частині спектра.

Перебіг аналізу. Наважку рослинної тканини масою 150–200 мг розтирають із 300–400 мкл екстракційного буфера в холодній ступці холодним товкачем. Гомогенат центрифугують протягом 5 хв за 12 000 g, отриманий супернатант використовувати для аналізу. Для цього реакційна суміш містить 2,93 мл 50 мМ К,Na-фосфатного буфера (рН 7,0), 30 мкл 17 мМ розчину аскорбінової кислоти 30 мкл 5 мМ розчину ЕДТА та 10 мкл клітинного екстракту. Реакція запускається внесенням у реакційну суміш 30 мкл 0,06 % розчину перекису водню. Контрольна кювета містить ті самі реактиви без перекису водню. Вимірювання оптичної густини проводять за довжини хвилі 290 нм протягом 100 с з інтервалом 1 с.

Розрахунок активності аскорбатпероксидази у відносних одиницях на один грам сухої маси проводиться за формулою:

$$A = \frac{\Delta D \times V \times X}{T \times L \times m \times \Delta m},$$

де:

A – активність ферменту;

ΔD – зміна оптичної густини (різниця між оптичною густиною в кінці реакції та оптичною густиною на початковий момент часу);

V – загальний об'єм отриманої витяжки, мл;

X – кінцеве розведення витяжки в кюветі (відношення об'єму реакційної суміші до кількості екстракту, що внесений у кювету);

T – час реакції, с;

L – товщина шару, см;

m – маса наважки, г;

Δm – відношення сухої маси до сирови.

Для визначення активності ферменту на 1 мг білка, який міститься у рослинному матеріалі, використовують таку формулу:

$$A = \frac{\frac{\Delta D}{T} \times X}{L \times C},$$

де:

A – активність ферменту;

ΔD – зміна оптичної густини;

X – кінцеве розведення витяжки в кюветі;

T – час реакції, с;

L – товщина шару, см;

C – вміст білка у пробі, мг.

Вимірювання активності аскорбат-пероксидази проводять у кількох (не менше трьох) біологічних та аналітичних повторюваннях.

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Наведіть класифікацію ферменту. До якого класу ферментів він належить?
2. Наведіть значення цього ферменту для рослин. У яких процесах рослиної життєдіяльності бере участь цей фермент?
3. Охарактеризуйте принцип методу визначення активності аскорбатоксидази у рослинах.
4. Як проводиться аналіз активності ферменту за наведеним методом?

РОБОТА 9.15. КОЛОРИМЕТРИЧНИЙ МЕТОД ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ НІТРАТРЕДУКТАЗИ В РОСЛИНАХ

Принцип методу. Нітратредуктаза каталізує реакцію відновлення нітратів до нітритів. Цей метод оснований на визначенні кількості нітритів, які утворюються за визначений проміжок часу під дією ферменту.

Перебіг аналізу. Для аналізу рослинний матеріал ріжуть на тонкі шматочки (приблизно 2×3 мм) та зважують на аналітичних терезах $1 \pm 0,001$ г. Наважку примішують у пробірки, які мають пробки з обладнанням для відкачування повітря. У кожную пробірку додають 5 мл 0,06 М фосфатного буфера, 1 мл 0,1 М розчину яблучної кислоти, який попередньо нейтралізують КОН, 1 мл 0,1 М розчину нітрату калію та 2 мл дистильованої води. Проводять вакуум-інфільтрацію розчинів, для чого закривають пробірки пробками з гумовими трубками, обладнаними затиском, і відкачують із пробірок повітря. Далі повітря повільно впускають у пробірки. У цей час розчини проникають у рослинну тканину і створюють необхідні умови для дії ферменту. Після вакуум-інфільтрації повітря з пробірок знову відкачують і пробірки примішують до термостата з температурою

37 °С на 30 хв. Через зазначений час пробірки відкривають і в них додають 1 мл оцтової кислоти для припинення реакції та 3 мл насиченого розчину сульфату амонію для осадження білків. У контрольні пробірки додають усі реактиви, як і в дослідну, але оцтову кислоту доливають відразу після вакуум-інфільтрації. Вміст контрольних і дослідних пробірок фільтрують через паперові фільтри (синя стрічка) і, залежно від активності ферменту, об'єм фільтрату або лишают незмінним, або доводять до 15 мл.

Для визначення нітритів беруть 5 мл фільтрату, додають 2 мл реактиву Грісса, перемішують і вимірюють оптичну густину забарвлених розчинів на фотоелектроколориметрі за зеленим світлофільтром, використовуючи кювету завтовшки 5 мм. Для розрахунків використовують дані калібрувального графіка. Обчислення проводять за формулою:

$$X = \frac{a \times V \times 100}{n},$$

де:

X – активність нітратредуктази, мкг NO_2^- на 100 г рослинного матеріалу;

a – кількість NO_2^- , знайдена за калібрувальним графіком, мкг;

V – об'єм фільтрату, який отримано з наважки рослинного матеріалу, мл;

n – наважка рослинного матеріалу, г;

100 – коефіцієнт для перерахунку на 100 г рослинного матеріалу.

Побудова калібрувального графіка

Калібрувальний графік будується на основі зразкового розчину нітриту натрію. Для приготування зразкового розчину 0,4927 г NaNO_2 розчиняють у дистильованій воді і доводять об'єм розчину у мірчій колбі до 1 л. Приготований розчин зберігається у темній пляшці. Він містить 0,1 мг азоту або 0,33 мг оксиду азоту в 1 мл. У день проведення аналізу з цього розчину готують робочий стандартний розчин, який містить 0,001 мг азоту або 0,0033 мг оксиду азоту в 1 мл. Далі робочий розчин вносять від 0,5 до 2,5 мл у пробірки для проведення аналізу (перша пробірка містить 0,5 мл розчину; друга – 1,0, третя – 1,5, четверта – 2, п'ята – 2,5 мл). У кожен пробірку додають до 5 мл дистильовану воду і 2 мл реактиву Грісса. Вміст пробірок перемішують та визначають оптичну густину на фотоелектроколориметрі за зеленим світлофільтром, використовуючи кювети з оптичним шляхом 5 мм. На основі отриманих даних будують калібрувальний графік.

Обладнання

1) пробірки, обладнані пробками з пристроєм для відкачування повітря; 2) термостат; 3) паперові фільтри; 4) пробірки; 5) мірчі колби об'ємом 100 та 250 мл; 6) мірчі циліндри об'ємом 25 мл; 7) піпетки об'ємом 2, 5 та 10 мл; 8) фарфорова ступка з товчачиком; 9) фотоелектроколориметр.

Реактиви

1) фосфат натрію двозаміщений (Na_2HPO_4); 2) фосфат калію однозаміщений (KH_2PO_4); 3) яблучна кислота 0,1 М розчин; 4) гідроксид калію (KOH); 5) нітрат калію (KNO_3) 0,1 М розчин; 6) сульфат амонію ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) насичений розчин; 7) оцтова кислота, концентрована; 8) реактив Грісса, або кислота сульфанілова безводна, кислота оцтова льодяна, х. ч. α -нафтіламін, порошок цинковий; 9) нітрит натрію (NaNO_2).

Приготування реактивів

Реактив № 8. Реактив Грісса може готуватися з окремих компонентів або з готової суміші.

Приготування реактиву з окремих компонентів можливе двома способами:

Спосіб 1. 0,1 г α -нафтіламіну розчиняють в 100 мл води під час кип'ятіння протягом 15 хв. Розчин охолоджують, підкислюють 5 мл оцтової кислоти та додають об'єм до 100 мл розчином сульфанілової кислоти. Суміш зберігають у склянці з темного скла з добре притертою пробкою. Реактив повинен бути безбарвним, допускається слабо-рожеве забарвлення, яке за умови розведення водою у співвідношенні 1 : 40 повинно зникати. У протилежному разі для знебарвлення розчин реактиву збовтують із цинковим порошком. Для аналізу використовують відстояний безбарвний розчин, який відбирають піпеткою.

Спосіб 2. Готують два розчини:

Розчин 1. 0,5 г сульфанілової кислоти розчинити в 150 мл 2 N оцтової кислоти (CH_3COOH).

Розчин 2. 0,22 г α -нафтіламіну розчинити в 200 мл води, додати 150 мл концентрованої оцтової кислоти (CH_3COOH).

Змішати розчини 1 та 2.

У зв'язку з канцерогенністю α -нафтіламіну запропоновано кілька замінників: 1-нафтіламін-7-сульфокислота (кислота Клеве), N-1-нафтилетилендіамін, диметил-1-нафтиламін. Замість сульфанілової кислоти можна застосовувати сульфаніламід.

Приготування реактиву з готової суміші Грісса

10 г реактиву Грісса (заводська суміш α -нафтіламіну та сульфанілової кислоти), зваженого з погрішністю не більше 0,1 г, розчиняють у 100 мл 12 % розчину оцтової кислоти. Якщо реактив погано розчиняється, його можна нагріти до 60 °С, краще на магнітній мішалці.

Реактив Грісса необхідно зберігати в холодильнику. Саму реакцію варто також проводити за температури 5 °С. За такої температури не відбувається розкладання солі діазонію.

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАЇ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Які реакції каталізує нітратредуктаза? Яке значення мають ці реакції у життєдіяльності рослин?
2. Що таке вакуум-інфільтрація? Для чого вона проводиться?
3. Дайте характеристику принципу методу визначення активності нітратредуктази в рослинах.
4. Як будується калібрувальний графік? Яка речовина використовується для його побудови?
5. Які речовини заважають визначенню? Як їх позбутися?

РОБОТА 9.16. ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ТИРОЗИНАЗИ

Принцип методу. Тирозиназа належить до типових оксидаз. Цей фермент бере участь у реакціях окислення тирозину, фенолу, пірокатехіну, м-крезолу, п-крезолу, пірогалолу та інших речовин у присутності вільного кисню. Оптимальна кислотність середовища для дії ферменту знаходиться в межах рН 6–8. Дія ферменту на тирозин у присутності кисню повітря приводить до утворення меланіну (чорний пігмент). Визначення активності тирозинази оснований на утворенні бромиду під час окислення броміду меланіном. Кількість утвореного бромиду визначається титриметричним методом.

Перебіг аналізу. 2–3 г свіжого рослинного матеріалу ретельно розтирають у ступці з невеликою кількістю дистильованої води. Гомогенат переносять у мірчу колбу або мірчий циліндр об'ємом 50 мл і доводять його об'єм дистильованою водою до 50 мл, перемішують і дають осісти осад. Якщо осадження проходить погано, рідину центрифугують. Беруть 10 мл прозорої витяжки, переносять у конічну колбу об'ємом 250 мл, додають 10 мл 0,05 % розчину тирозину, 2–3 краплі толуолу і витримують суміш протягом 4 год за температури 40 °С у термостаті. Далі до суміші додають 1 мл 5 % розчину карбонату натрію, 3 мл 10 % розчину хлориду барію, нагрівають на електричній плитці до кипіння і фільтрують через паперовий фільтр у чисту суху колбу для титрування. Колбу, у якій проводилася реакція, і осад на фільтрі тричі промивають гарячою дистильованою водою порціями по 8–10 мл. Фільтрат охолоджують, додають 10 мл 0,03 N бромат-бромідного реактиву та 4 мл розчину соляної кислоти (1 : 1), накривають колбу покривним склом, перемішують і залишають на 10 хв. Бром, який утворився під час реакції, титрують 0,2 % розчином метилоранжу до появи червоного забарвлення, яке не зникає. Паралельно проводять контрольне титрування. Для цього в колбу для титрування наливають 10 мл прозорої витяжки, 25 мл дистильованої води, 10 мл бромат-бромідного реактиву, 4 мл розчину соляної кислоти (1 : 1), накривають колбу покривним склом, перемішують вміст круговими рухами і залишають на 10 хв. Через 10 хв вміст колби титрують розчином метилоранжу.

Увага: для уникнення втрат бром у колби не можна струшувати; перемішувати треба тільки круговими рухами. Активність ферменту обчислюють за формулою:

$$X = \frac{166,8 \times 50 \times K \times (a - b)}{10 \times n \times 4} = \frac{208,5 \times K \times (a - b)}{n},$$

де:

X – активність тирозинази, мкМ окисленого тирозину за 1 год на 1 г дослідного рослинного матеріалу;

50 – загальний об'єм дослідного розчину, мл;

10 – об'єм дослідного розчину, який взято для визначення активності ферменту, мл;

4 – час проведення реакції ферменту з тирозином, год;

K – нормальність титрованого розчину метилоранжу, г;

a – об'єм розчину метилоранжу, який витрачено на титрування контрольного розчину, мл;

b – об'єм розчину метилоранжу, який витрачено на титрування дослідного розчину, мл;

166,8 – коефіцієнт для перерахунку об'єму нормального розчину тирозину у мікромолі;

n – наважка рослинного матеріалу, г.

Обладнання

1) фарфорові ступки з товчачиками; 2) мірчі колби об'ємом 50 мл; 3) мірчі циліндри об'ємом 25 мл; 4) конічні колби об'ємом 250 та 500 мл; 5) центрифуга з центрифугальними пробірками; 6) термостат; 7) електрична плитка; 8) паперові фільтри; 9) бюретка для титрування; 10) лабораторний штатив із затиском; 11) покривне скло; 12) піпетки об'ємом 1, 5 та 10 мл.

Реактиви

1) тирозин ($C_9H_{11}NO_3$) 0,5 % розчин; 2) бромат-бромід 0,03 N розчин; 3) метилоранж ($C_{14}H_{14}N_3NaO_3S$) 0,2 % розчин; 4) хлорид барію ($BaCl_2$) 10 % розчин; 5) карбонат натрію (Na_2CO_3) 5 % розчин; 6) толуол (C_7H_8); 7) соляна кислота (HCl) розчин у дистильованій воді у співвідношенні 1 : 1 за об'ємом.

Приготування реактивів

Реактив № 1 (0,5 % розчин тирозину). 0,1 г тирозину примішують у мірчу колбу об'ємом 200 мл, додають 1,2 мл 5 % розчину карбонату натрію (Na_2CO_3) та 150 мл дистильованої води. Вміст колби нагрівають до повного розчинення тирозину, охолоджують і доводять об'єм розчину до 200 мл. Розчин зберігають у пляшці з темного скла у холодному місці.

Реактив № 2 (0,03 N розчин бромат-броміду). 0,8349 г $KBrO_3$ переносять у мірчу колбу об'ємом 1 л, додають 10 г KBr, розводять водою до 1 л і ретельно перемішують.

Реактив № 3 (0,2 % розчин метилоранжу (метилового оранжевого)). Зважують 2 г метилоранжу, розчиняють у дистильованій воді в мірчій колбі об'ємом 1 л. Об'єм розчину доводять до 1 л і фільтрують. Нормальність приготованого розчину встановлюють шляхом титрування розчину бромату калію. Для цього в колбу для титрування відбирають 10 мл 0,03 N розчину бромат-броміду, додають 30 мл дистильованої води, 4 мл розчину соляної кислоти (1 : 1) та титрують розчином метилоранжу до появи червоного забарвлення, яке не зникає. Нормальність розчину метилоранжу обчислюють за формулою:

$$K = \frac{10 \times 0,03}{a} = \frac{0,3}{a},$$

де:

K – нормальність розчину метилоранжу, г;

10 – об'єм розчину бромат-броміду, який взято для титрування, мл;

0,03 – нормальність розчину бромат-броміду, г/моль;

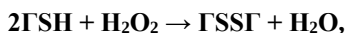
a – об'єм розчину метилоранжу, який витрачено на титрування 10 мл розчину бромат-броміду.

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАЙНЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Яке значення має тирозиназа в життєдіяльності рослин? До якого класу належить цей фермент?
2. Дайте характеристику принципу методу визначення активності тирозинази.
3. Чому після додавання бромат-броміду розчин не можна струшувати?
4. Як готується бромат-бромідний реактив?
5. Як встановити нормальність розчину метилоранжу?
6. Яка залежність існує між кількістю розчину метилоранжу, що використовується на титрування, та активністю ферменту? Поясніть.

РОБОТА 9.17. ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ГЛЮТАТІОН-ПЕРОКСИДАЗИ

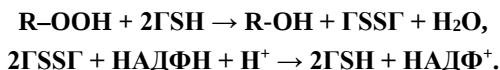
Глютатіон-пероксидаза (КФ 1.11.1.9) здійснює детоксикацію пероксиду водню та органічних пероксидів, за участю відновленого глютаіону:



У рослин глютаіон-пероксидаза локалізована в основному в цитоплазмі, а її основною функцією є детоксикація гідроперксидів фосфоліпідів.

Принцип методу. Активність глютаіон-пероксидази визначається непрямим методом за спряженою реакцією з глютаіонредуктазою. Окислений глюта-

тіон (GSSG), який утворюється внаслідок детоксикації гідропероксидів глутатіон-пероксидазою, відновлюється до GSH глутатіонредуктазою та НАДФН:



Швидкість реакції реєструють за зниженням оптичної густини за 340 нм внаслідок окислення НАДФН до НАДФ⁺.

Перебіг аналізу. Для визначення активності ферменту можна використовувати рослинний екстракт, приготований, як описано в роботі 9.15. Визначення проводять у пробі об'ємом 1,25 мл, яка містить 50 мМ калій-фосфатний буфер (pH 7,0), 0,5 мМ ЕДТА, 4 мМ NaN₃, 15 мМ GSH, 0,25 мМ НАДФН, 1 од/мл глутатіонредуктази, 0,2 мМ H₂O₂ та витяжку ферменту. Азид натрію додається в суміш для інгібування каталази, яка також розкладає пероксид водню. Реакцію починають послідовним додаванням глутатіонредуктази, H₂O₂ та ферментної витяжки. Оскільки реакція здатна відбуватися і без участі ферменту, паралельно проводять визначення зміни оптичної густини у холостій пробі, яка містить екстракційний буфер замість супернатанту у реакційній суміші. Для розрахунків використовують коефіцієнт молярної екстинції НАДФН, який становить 6 220 М⁻¹см⁻¹. Для визначення активності ферменту готується реакційна суміш, яка включає 1,25 мл фосфатного буфера, 100 мкл ЕДТА, 1 мл азиду натрію, 100 мкл НАДФН та 47 мг відновленого глутатіону (GSH) та доводять об'єм суміші дистильованою водою до 10 мл.

Далі у кювету послідовно додають по 1,076 мл реакційної суміші, 50 мкл глутатіонредуктази, 25 мкл пероксиду водню та 100 мкл рослинного екстракту. Для визначення зміни оптичної густини у холостій пробі замість супернатанту додають аналогічну кількість середовища гомогенізації. Оптичну густину реєструють протягом 90 с з інтервалом 10 с на спектрофотометрі за довжини хвилі 340 нм. У екстракті визначають концентрацію білка за методом Бредфорда.

Розрахувати питому активність глутатіон-пероксидази за формулою:

$$A = \frac{\Delta OD \times V_1}{\varepsilon \times V_2 \times C_{prot}},$$

де:

A – активність ферменту, од/мг білка;

ΔOD – зміна оптичного поглинання за 1 хв;

V_1 – об'єм проби, мл;

ε – коефіцієнт молярної екстинції;

V_2 – об'єм супернатанту, мл;

C_{prot} – концентрація білка в супернатанті (мг/мл).

За одну одиницю активності глутатіон-пероксидази приймають таку кількість ферменту, яка окислює 1 мкмоль НАДФН за 1 хв в 1 мг білка.

Обладнання

1) пробірки; 2) мірчі піпетки та автоматичні мікропіпетки; 3) спектрофотометр.

Реактиви

1) калій-фосфатний буфер pH 7,0 400 мМ; 2) етилендіамінотетраоцтова кислота (ЕДТА) 50 мМ; 3) азид натрію (NaN_3) 40 мМ; 4) нікотинамідаденіндинуклеотид фосфат відновлений (НАДФН) 25 мМ; 5) пероксид водню (H_2O_2) 10 мМ; 6) глутатіонредуктаза; 7) відновлений глутатіон.

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Наведіть характеристику ферменту та механізму його дії. Класифікація ферменту.
2. Дайте характеристику принципу методу визначення активності глутатіонпероксидази.
3. Як проводиться визначення активності глутатіонпероксидази?

РОБОТА 9.18. ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ГЛЮТАТІОНРЕДУКТАЗИ

Глутатіонредуктаза (КФ 1.6.4.2) каталізує НАДФН-залежне відновлення дисульфідних зв'язків у окисленому глутатіоні. У рослин ГР локалізована переважно у хлоропластах (близько 80 %). Проте невелика кількість ізоформ виявлена у мітохондріях, цитозолі та пероксисомах.

Принцип методу. Метод базується на визначенні швидкості реакції окислення НАДФН до НАДФ⁺. Зміну оптичного поглинання реєструють на спектрофотометрі за довжини хвилі 340 нм. Коефіцієнт молярного поглинання НАДФН за вказаної довжини хвилі становить $6\,220\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Перебіг аналізу. Для визначення активності глутатіонредуктази готують суміш, яка містить 1,25 мл фосфатного буфера pH 7, 100 мкл етилендіамінотетраоцтової кислоти, 6 мг окисленого глутатіону, 125 мкл розчину НАДФ. Об'єм суміші доводять дистильованою водою до 10 мл. Вимірювання активності проводять у кюветах спектрофотометра, для чого у них додають 1,15 мл реакційної суміші та 100 мкл ферментного препарату.

Оптичну густину реєструють протягом 90 с з інтервалом 10 с на спектрофотометрі за довжини хвилі 340 нм. Оскільки фермент відзначається низькою активністю, рекомендується реєструвати всі 4 знаки після розділового знака в показках оптичної густини. У супернатанті визначається концентрація білка за методом Бредфорда.

Розрахувати питому активність глутатіонредуктази за формулою:

$$A = \frac{\Delta OD \times V_1}{\varepsilon \times V_2 \times C_{prot}} \times 1\,000,$$

де:

A – активність ферменту, од./мг білка;

ΔOD – зміна оптичного поглинання за 1 хв;

V_1 – об'єм проби, мл;

ε – коефіцієнт молярної екстинції;

V_2 – об'єм супернатанту, мл;

C_{prot} – концентрація білка в супернатанті, мг/мл.

За одну одиницю активності глутатіонредуктази приймають таку кількість ферменту, яка окислює 1 мкмоль НАДФН за 1 хвилину в 1 мг білка.

Обладнання

1) пробірки; 2) мірчі піпетки та автоматичні мікропіпетки; 3) спектрофотометр.

Реактиви

1) калій-фосфатний буфер pH 7,0 400 мМ; 2) етилендіамінотетраоцтова кислота (ЕДТА) 50 мМ; 3) нікотинамідаденіндинуклеотид фосфат відновлений (НАДФН) 25 мМ; 4) окислений глутатіон.

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАТЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Наведіть характеристику ферменту та механізму його дії. Класифікація ферменту.

2. Дайте характеристику принципу методу визначення активності глутатіонредуктази.

3. Як проводиться визначення активності глутатіонредуктази?

ГІДРОЛАЗИ (КФ 3)

РОБОТА 9.19. ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ САХАРАЗИ (ІНВЕРТАЗИ) У РОСЛИНАХ

Принцип методу. Сахараза (інвертаза, β -фруктофуранозідаза) діє на складні цукри, які містять залишок β -фруктози – сахарозу, рафінозу, генціанозу, стахіозу. Найчастіше і в найбільшій кількості в рослинах міститься сахароза. Активність ферменту визначають за кількістю редуруючих цукрів, які утворилися за певний проміжок часу інкубації.

Перебіг аналізу. 1 г листя або інших органів рослин розтирають у ступці з невеликою кількістю дистильованої води до гомогенного стану. Гомогенат переносять у мірчу колбу об'ємом 50 мл, розводять дистильованою водою до мітки і ретельно перемішують. Беруть по 10 мл зависі в 4 мірчі колби об'ємом 100 мл (або в колби об'ємом 50 мл, якщо беруть меншу наважку, або активність ферменту слабка).

Одну колбу нагрівають на електричній плитці до кипіння, кип'ять протягом 1–2 хв для інактивації ферменту (ця колба буде слугувати контролем) і охолоджують. В усі колби додають по 5 мл ацетатного буфера з рН 5, 10 мл свіжо-приготованого 5 % розчину сахарози, 4 краплі толуолу та примішують у термостат з температурою 40 °С на 2 год. Після цього у колби додають по 2,5 мл 1 N розчину гідроксиду натрію, 1 краплю фенолфталеїну і краплями 10 % розчин сульфату цинку до знебарвлення індикатора (приблизно 1 мл розчину ZnSO_4). Якщо дослідний розчин інтенсивно забарвлений у темний колір, то відразу додають 1 мл сульфату цинку, перемішують та дають відстоятися. Якщо розчин повітлішає, більше сульфат цинку не додають. В іншому випадку додають ще декілька крапель ZnSO_4 до просвітлення розчину. Об'єм розчину в колбах доводять дистильованою водою до мітки, перемішують і фільтрують через паперовий фільтр. У фільтраті визначають вміст редукуючих (відновних) цукрів.

Для цього з кожної колби беруть 10 або 5 мл фільтрату у великі пробірки (якщо беруть 5 мл, то у пробірки додають по 5 мл дистильованої води), додають 10 мл мідно-лужного реактиву. Вміст пробірок перемішують, їх закривають маленькими лійками, примішують у склянку з гарячою водою та нагрівають на електричній плитці протягом 15 хв. Після нагрівання пробірки швидко охолоджують, занурюючи у холодну воду. У них додають по 5 мл суміші щавлевої та сірчаної кислот для розчинення червоного осаду закису міді, який вступає у взаємодію з йодом, що міститься в мідно-лужному реактиві. Залишок йоду титрують 0,01 N розчином тіосульфату натрію у присутності 0,5 % розчину крохмалю. Активність ферменту обчислюють за формулою:

$$X = \frac{50 \times 100 \times 0,0556 \times (198 + a + b) \times (a - b)}{10 \times 10 \times t \times n} = \frac{0,278 \times (198 + a + b) \times (a - b)}{t \times n},$$

де:

X – активність сахарози в мкМ цукру, який утворився протягом 1 год на 1 г дослідного матеріалу;

50 – об'єм витяжки, який отримано з наважки дослідного матеріалу, мл;

100 – об'єм розчину, який отримано після дії сахарози, мл;

0,00556 – коефіцієнт перерахунку мікрограмів у мікромолі;

198 + a + b – кількість цукру у мкг, яка відповідає 1 мл 0,01 N розчину тіосульфату натрію;

10 – об'єм фільтрату, який взято для визначення цукрів, мл;

a – об'єм розчину тіосульфату натрію, який витрачено на титрування контрольного зразка, мл;

b – об'єм розчину тіосульфату натрію, який витрачено на титрування дослідного зразка, мл;

t – час дії ферменту, год;

n – наважка рослинного матеріалу, г.

Обладнання

1) фарфорові ступки з товчачиками; 2) мірчі колби об'ємом 50 та 100 мл; 3) маленькі лійки; 4) бюретки для титрування; 5) лабораторний штатив із затиском; 6) електрична плитка; 7) піпетки об'ємом 2, 5 та 10 мл; 8) термостат; 9) паперові фільтри (синя стрічка); 10) великі пробірки; 11) водяна баня; 12) хімічні склянки.

Реактиви

1) ацетатний буфер pH 5; 2) 5 % розчин сахарози; 3) толуол; 4) сульфат цинку (ZnSO_4) 10 % розчин; 5) гідроксид натрію (NaOH) 1 N розчин; 6) фенолфталейн 0,1 % розчин у 60 % етанолі; 7) мідно-лужний реактив; 8) тіосульфату натрію ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 0,01 N розчин готується з фіксаналу; 9) крохмаль (індикатор) 0,5 % розчин; 10) суміш щавлевої та сірчаної кислот.

Приготування реактивів

Реактив № 1 (ацетатний буфер pH 5). У мірчу колбу об'ємом 100 мл наливають 29 мл 1 N розчину гідроксиду натрію, додають 2,5 мл концентрованої оцтової кислоти, розводять дистильованою водою до 100 мл і ретельно перемішують.

Реактив № 7 (мідно-лужний реактив). 75 г безводного карбонату натрію (Na_2CO_3) розчиняють у 400 мл дистильованої води. В іншій колбі розчиняють у 400 мл дистильованої води 12 г сульфату міді ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) та 21,5 г винної кислоти, далі цей розчин поступово додають у розчин карбонату натрію, постійно збовтуючи (треба уникати виділення вуглекислого газу). До розчину додають 0,890 г йодату калію (KIO_3) та 8 г йодистого калію (KI) і збовтують до повного розчинення солей. Отриманий розчин переносять у мірчу колбу та доводять його об'єм дистильованою водою до 1 л. Далі розчин переносять у колбу об'ємом 2 л, примішують у водяну баню з холодною водою, нагрівають до кипіння та кип'ятять 5 хв. Після цього розчин залишають на ніч для охолодження та відстоювання. Розчин зберігають у щільно закритій пляшці.

Реактив № 10. Суміш щавлевої та сірчаної кислот: зважують 60 г щавлевої кислоти, розчиняють у 800 мл дистильованої води. До розчину додають 70 мл концентрованої сірчаної кислоти (густина 1,84) та доводять об'єм рідини до 1 л.

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Дайте характеристику дії ферменту сахарази. Яке значення має цей фермент у життєдіяльності рослин?

2. Наведіть характеристику принципу методу визначення активності сахарази в рослинах.

3. Як визначається вміст відновних цукрів у рослинному матеріалі?
4. Для чого мідно-лужний реактив містить йодат калію? Які процеси відбуваються під час взаємодії мідно-лужного реактиву з цукрами?
5. Яка залежність існує між кількістю відновних цукрів та активністю ферменту?
6. Як обчислюється активність ферменту в рослинному матеріалі? Для чого потрібен контрольний дослід?

РОБОТА 9.20. ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ АМІЛАЗИ

Принцип методу. Відповідно до складу крохмалю, який складається з амілопектину (β -амілози) та амілози (α -амілози), існують і два ферменти: α -амілаза та β -амілаза.

У насінні злаків міститься вільна β -амілаза, яка може бути екстрагована водою і зв'язана α -амілаза. α -амілаза водою не екстрагується і неактивна. Під час проростання насіння α -амілаза переходить у активний стан. β -амілаза більш термостійка, ніж α -амілаза.

Функція амілаз – руйнування глікозидних зв'язків у полісахаридах, α -амілаза діє на глікозидні зв'язки, які знаходяться в середині полісахаридних ланцюжків, а β -амілаза – на невідновний кінець ланцюга і послідовно відокремлює залишки мальтози від нього.

Мальтоза, яка утворюється в результаті дії амілаз на крохмаль, може бути визначена одним зі способів, якими визначається кількість моносахаридів. За кількістю мальтози, яка утворюється, можна визначати активність амілаз.

Перебіг аналізу. Беруть 2 г картоплі або 5 г попередньо подрібненого борошна на зернових культурах, розтирають у фарфоровій ступці з 1 мл 0,2 М фосфатного буферного розчину з рН 5,6 до гомогенного стану. Далі додають ще 6 мл буферного розчину і переносять гомогенат у мірчу колбу об'ємом 100 мл, змиваючи ступку малими порціями дистильованої води. Об'єм витяжки в колбі доводять до 100 мл дистильованою водою та енергійно перемішують.

Визначення загальної активності α - та β -амілази

Не даючи витяжки відстоятися, відбирають по 25 мл суспензії у дві мірчі колби об'ємом 50 мл. Далі в кожену колбу додають по 10 мл 2 % свіжоприготованого розчину крохмалю. Вміст однієї з колб (контроль) нагрівають на електричній плитці до кипіння та кип'ятять протягом 1 хв для інактивації ферменту. Після охолодження контрольної колби (для прискорення охолодження колбу занурюють у холодну воду) обидві колби примішують до термостату з температурою 40 °C на 2 год. Далі колби виймають із термостату, в кожену колбу додають по 4 мл 8 % розчину щавлевої кислоти та ставлять у киплячу водяну баню на 15 хв для гідролізу сахарози і уникнення впливу сахарози під час визначення ак-

тивності амілази. Розчини в колбах охолоджують і нейтралізують 1 N розчином гідроксиду натрію у присутності 1 краплі 0,1 % розчину фенолфталеїну. Вміст колб розводять дистильованою водою до 50 мл і перемішують.

У розчинах визначають вміст відновних цукрів. Для цього з верхньої частини розчинів після їх відстоювання беруть по 10 мл у конічні колби об'ємом 100 мл, у кожену колбу додають по 10 мл мідно-лужного реактиву, перемішують і ставлять у киплячу водяну баню на 15 хв. Далі колби охолоджують, занурюючи їх у холодну воду, поступово додають 5 мл суміші сірчаної та щавлевої кислот, постійно збовтуючи, і після розчинення осаду закису міді залишок йоду титрують 0,01 N розчином тіосульфату натрію. Для визначення активності амілази в картоплі розчин крохмалю (індикатор) не додають. Під час роботи з іншими об'єктами в реакційну суміш для титрування додають 0,5 % розчин крохмалю.

Активність амілази обчислюють за формулою:

$$X = \frac{100 \times 50 \times (1,43 \times (a - b) + 0,96)}{25 \times 10 \times 2 \times n} = \frac{14,3 \times (a - b) + 9,6}{n},$$

де:

X – активність амілази, мкМ мальтози, яка утворилася протягом 1 год на 1 г дослідного матеріалу;

a – об'єм 0,01 N розчину тіосульфату натрію, який витрачено на титрування контрольного зразка, мл;

b – об'єм 0,01 N розчину тіосульфату натрію, який витрачено на титрування дослідного зразка, мл;

100 – загальний об'єм витяжки, мл;

50 – об'єм розчину, який отримано після ферментативного перетворення крохмалю у мальтозу, мл;

25 – об'єм дослідного розчину, який взято для визначення активності ферменту, мл;

10 – об'єм розчину, який взято для визначення відновних цукрів, мл;

2 – термін дії ферменту, год;

n – наважка дослідного матеріалу, г;

1,43 ($a - b$) + 0,96 – кількість мальтози (мкМ), яку виявлено в 10 мл дослідного розчину.

Визначення активності α -амілази

У витяжці, яка залишилася після визначення загальної активності α - та β -амілаз, визначають активність α -амілази. Для цього залишок розчину активно перемішують і відразу беруть по 25 або 20 мл суспензії у дві мірчі колби об'ємом 50 мл. В обидві колби доливають по 10 мл 2 % свіжоприготованого розчину крохмалю. Одну з колб (контрольну) кип'ятять протягом 1 хв. Другу колбу нагрівають у водяній бані протягом 15 хв за температури 70 °C (температура підтриму-

ється у межах $70 \pm 0,5$ °C). Контрольну і дослідну колби швидко охолоджують, занурюючи у холодну воду, і ставлять до термостату за 40 °C на 2 год. Далі колби виймають і ставлять на електричну плитку, доводять їх вміст до кипіння та кип'ять протягом 3 хв. Розчини охолоджують та нейтралізують 0,1 N розчином гідроксиду натрію у присутності фенолфталеїну. Об'єм вмісту колб доводять дистильованою водою до 50 мл, перемішують і визначають вміст мальтози методом, який наведено вище, використовуючи ту саму формулу для обчислення результатів.

Обладнання

1) фарфорова ступка з товкачиком; 2) мірчі колби об'ємом 50 та 100 мл; 3) мірчі циліндри об'ємом 25 та 250 мл; 4) конічні колби об'ємом 100 та 500 мл; 5) електрична плитка; 6) водяна баня; 7) термостат; 8) піпетки об'ємом 2, 5 та 10 мл; 9) термометр.

Реактиви

1) фосфат натрію двозаміщеного (Na_2HPO_4) 0,2 M розчин; 2) фосфат калію однозаміщеного (KH_2PO_4) 0,2 M розчин; 3) крохмаль 0,5 % та 2 % розчини; 4) щавлева кислота ($\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$) 8 % розчин; 5) гідроксид натрію (NaOH) 0,1 N розчин; 6) фенолфталеїн 0,1 % розчин у 60 % етанолі; 7) суміш щавлевої та сірчаної кислот; 8) мідно-лужний реактив; 9) тіосульфат натрію ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 0,01 N розчин (готується з фіксаналу).

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. До якого класу ферментів належить амілаза? Наведіть класифікацію ферментів.
2. У перетворенні яких речовин бере участь амілаза? Чим відрізняються α - та β -амілази?
3. Принцип методу визначення активності амілази. Який фермент може заважати визначенню активності амілази і як його інактивують?
4. Що треба зробити, щоб окремо визначити активність α - та β -амілази?
5. Які продукти реакції утворюються внаслідок дії амілази? Як їх визначити?

РОБОТА 9.21. ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ АМІЛАЗИ ЗА СМІТОМ, РОЄМ

Принцип методу. Метод Сміта, Роя ґрунтується на колориметричному визначенні нерозкладеного ферментом крохмалю після його обробки розчином йоду.

Перебіг аналізу. Для приготування ферментної витяжки (за температури 4° C) наважку рослинного матеріалу 5 г приміщують в охолоджену фарфорову ступку і доливають 50 мл 0,005 M фосфатного буфера (pH 7,4). Рослинну масу розтирають і залишають стояти за температури 0–4 °C протягом 30 хв, періодично пере-

мішуючи. Далі осад відокремлюють шляхом центрифугування за 900 обертів на хвилину або фільтрують через щільний складчастий фільтр.

У дослідні і контрольні пробірки доливають по 1 мл 3 % розчину свіжоприготованого крохмалю. У третю серію пробірок (стандартна проба) наливають 1 мл суміші такого складу: 50 мл дистильованої води + 0,5 мл 0,1 N HCl + 0,1 мл 0,3 % I₂.

У кожену пробірку додають 3 мл ацетатного буфера (рН 5,0), 1 мл 0,5 М CaCl₂ і інкубують за температури 40° С протягом 10–15 хв. Далі у дослідні пробірки додають по 1 мл ферментного препарату і всі пробірки інкубують ще 10 хв за такої самої температури. Після цього в кожену пробірку додають 0,5 мл 0,1 N HCl для інактивації ферменту.

У контрольні і стандартні пробірки додають по 1 мл ферментного розчину і переносять у мірчі колби на 50 мл, що містять 0,5 мл 0,1 N HCl та 40 мл дистильованої води. У кожену колбу додають по 0,1 мл йодного розчину (3 % KI + 0,3 % I₂). Об'єм рідини у мірчих колбах доводять до мітки дистильованою водою. Оптичну густину розчинів вимірюють на фотоелектроколориметрі із оранжевим світлофільтром (610 нм), використовуючи кювету з оптичним шляхом 10 мм. Активність ферменту розраховують за формулою:

$$P = \frac{A - B}{A} \times C,$$

де:

P – активність ферменту (за одиницю активності приймають кількість білка, що гідролізує 10 мг крохмалю у хв за певних умов);

A – оптична густина контрольного розчину;

B – оптична густина аналізованого розчину;

C – кількість крохмалю, який містився у вихідному розчині.

Обладнання

1) холодильник; 2) термостат; 3) фотоелектроколориметр; 4) конічні колби об'ємом 200 мл; 5) пробірки; 6) мірчі колби на 1 л; 7) мірчі колби об'ємом 50 мл.

Реактиви

1) фосфатний буфер (рН 7,4); 2) 0,1 М ацетатний буфер рН 5 (для приготування змішують 33 мл 0,1 N розчину оцтової кислоти і 76 мл 0,1 N розчину ацетату натрію); 3) 3 % розчин крохмалю в ацетатному буфері; 4) 1,0 N розчин HCl; 5) 0,5 М розчин CaCl₂; 6) 3 % розчин KI; 7) 0,3 % розчин I₂ у 3 % розчині йодиду калію.

Приготування реактивів

Реактив № 1 (фосфатний буфер (рН 7,4)). 0,2 М розчин Na₂HPO₄ (31 г Na₂HPO₄·2H₂O у 1 л води) і 0,2 М розчин KH₂PO₄ (33,61 г KH₂PO₄·2H₂O чи 71,7 г KH₂PO₄·12H₂O у 1 л води). Змішують 81 мл розчину Na₂HPO₄ і 19 мл розчину

KH_2PO_4 і розбавляють суміш до 200 мл. Одержують 0,1 М фосфатний буфер з рН 7,4. Далі буферну суміш розводять у 20 разів і на рН-метрі перевіряють рН. Зсув значень рН після розведення водою компенсують за допомогою додавання 0,2 М розчинів солей.

Реактив № 2 (0,1 М ацетатний буфер рН 5). Для приготування змішують 33 мл 0,1 N розчину оцтової кислоти і 76 мл 0,1 N розчину ацетату натрію.

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. До якого класу ферментів належить амілаза? Наведіть класифікацію ферментів.
2. У перетворенні яких речовин бере участь амілаза? Чим відрізняються α - та β -амілази?
3. Охарактеризуйте принцип методу.
4. Порівняйте наведені вище методи визначення активності амілази.

РОБОТА 9.22. ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ АМІЛАЗИ У РОСЛИННИХ ТКАНИНАХ (ЗА В. С. АСАТІАНІ У МОДИФІКАЦІЇ Ю. Г. ПРИСЕДСЬКОГО)

Внаслідок високого вмісту у листках рослин редукуючих цукрів дуже важко використовувати методи аналізу амілазної активності, що основані на вимірі зростання кількості мономерних вуглеводів, оскільки ці показники маскуються їх великою кількістю у рослинних тканинах.

Принцип методу. Вимірювання активності амілази проводиться за модифікованою нами методикою В. С. Асатіані, розробленою для аналізу амілазної активності крові і основаною на вимірі збільшення вмісту крохмалю в інкубаційному середовищі після дії ферменту.

Перебіг аналізу. Наважку листя 2,5 г розтирають у ступці з дистильованою водою і переносять у колбу. Об'єм витяжки доводять до 10 мл. Отриману витяжку залишають стояти 30 хв, періодично збовтуючи. За цих умов у розчині вилучається фермент. Після настоювання суміш розділюють центрифугуванням за 4 000 об./хв протягом 10–15 хв. 1 мл отриманої надосадової рідини вносять до пробірок, витримують за 25 °С і у пробірки вносять 5 мл 1,2 % крохмалю, 3 мл фосфатного буфера рН 7,2 і 1 мл дистильованої води. Суміш витримують у термостатованій бані за 25 °С протягом 30 хв для інкубації ферменту. Після закінчення цього часу діяльність ферменту припиняють додаванням в інкубаційне середовище 2 мл 1 N соляної кислоти. Паралельно з цією пробіркою термостатується проба з усіма компонентами, крім витяжки ферменту. Через 30 хв у другу пробірку вносять 2 мл соляної кислоти і 1 мл витяжки. Як холостий дослід використовують пробірку, що містить замість крохмалю 5 мл дистильованої води. Після

інкубації ферменту в мірчі колби на 50 мл, що містять приблизно 30 мл дистильованої води та 0,5 мл 1 N розчину соляної кислоти, вносять 0,2 мл дослідного розчину і 0,1 мл 0,3 % розчину йоду у 3 % йодиді калію. Об'єм рідини доводиться до 50 мл. Синє забарвлення, що утворилося внаслідок реакції, вимірюється на фотоелектроколориметрі або спектрофотометрі за довжини хвилі 720–750 нм (червоний світлофільтр). За різницею між вмістом крохмалю в дослідній і контрольній пробах обчислюють активність ферменту за формулою:

$$A = \frac{C_{\text{досл.}} - C_{\text{контр.}}}{t \times n},$$

де:

A – активність ферменту, мг/г·год;

$C_{\text{досл.}}$ – вміст крохмалю у дослідній пробі, мг;

$C_{\text{контр.}}$ – вміст крохмалю у контрольній пробі, мг;

t – термін інкубації ферменту, год;

n – наважка рослинного матеріалу, г.

Розрахунки вмісту крохмалю проводяться за калібрувальним графіком.

Побудова калібрувального графіка

Для приготування стандартного розчину наважку розчинного крохмалю 0,600 г розчиняють у 30 мл дистильованої води. Об'єм отриманого розчину доводять у мірчій колбі до 50 мл. У шість пробірок вносять 5, 4, 3, 2, 1 і 0,5 мл стандартного розчину крохмалю. Об'єм рідини в усіх пробірках доводять до 5 мл. У цьому пробірку замість крохмалю вносять 5 мл дистильованої води (холоста проба). В усі пробірки доливають по 3 мл фосфатного буфера рН 7,2 і по 1 мл дистильованої води. Пробірки термостатуються за 25 °С протягом 30 хв. Після термостатування у них вносять по 2 мл 1 N соляної кислоти. Подальше визначення таке саме, як у досліді. На підставі отриманих даних будують калібрувальний графік.

Обладнання

1) мірчі колби об'ємом 50 мл; 2) пробірки об'ємом 10 мл; 3) мірчі піпетки на 1, 2 та 5 мл; 4) термостат; 5) фотоелектроколориметр; 6) кювети з оптичним шляхом 10 мм; 7) аналітичні терези.

Реактиви

1) дистильована вода; 2) соляна кислота (HCl) 1 N розчин; 3) крохмаль марки ч. д. а.; 4) йод (I₂); 5) йодид калію (KI).

Приготування реактивів

0,3 % розчин йоду у 3,0 % розчині йодиду калію. Зважують 3,0 г йодиду калію і розчиняють у 60–70 мл дистильованої води. Після повного розчинення солі об'єм розчину доводять до 100 мл. Зважують 0,3 г металевого йоду і примішують його у фарфорову ступку. Йод ретельно розтирають товкачиком з невели-

кою кількістю розчину йодиду калію до повного його розчинення. Отриманий розчин йоду переносять у скляну посудину. Залишки йоду на ступці змивають розчином йодиду калію.

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Наведіть принцип методу визначення амілази за руйнуванням крохмалю у рослинному матеріалі.
2. Порівняйте цей метод із методами, основанийими на накопиченні у середовищі мономерних цукрів. Які його переваги?
3. Як будується калібрувальний графік?
4. Охарактеризуйте способи приготування реактивів, які використовуються в роботі.

РОБОТА 9.23. ВИЗНАЧЕННЯ МОЛОКОЗСІДАЛЬНОЇ (СИЧУЖНОЇ) АКТИВНОСТІ

Принцип методу. Метод оснований на визначенні часу, під час якого відбувається зсідання молока. Субстратом для визначення сичужної активності є свіже натуральне молоко або 12 % розчин сухого молока з додаванням 10^{-3} M $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1 мл 15 % розчину CaCl_2 на 100 мл молока), рН субстрату доводять соляною кислотою до 6,0.

Перебіг аналізу. У 3 пробірки вносять по 10 мл субстрату і розміщують у водяну баню за 35 °С (виміри також можуть проводитися за інших температур: 30, 35, 40, 45 °С, що дає змогу встановити термостабільність ферментного препарату). Через 1–2 хв у дослідні пробірки вносять 1 мл 0,1 % розчину ферменту (відношення фермент–субстрат 1 : 10), а в контрольну пробірку 1 мл кип'яченого розчину ферменту. Суміш струшують і розміщують у баню за відповідної температури. Під час струшування вмикають секундомір і починають відлік часу зсідання молока, який закінчується під час появи у пробірках щільного згустку. Час, за який утворюється згусток, умовно вважають молокозсідальною активністю (МЗА), у хвиликах. За одиницю прийнята кількість ферменту, за допомогою якого зсідается 100 мл молока за 40 хв за 35 °С. Розрахунок ведуть за такою формулою:

$$\text{МЗА} = \frac{40 \times 100 \times K}{P \times A},$$

де:

МЗА – молокозсідальна активність препарату, од./г;

K – коефіцієнт розведення препарату ферменту;

P – час зсідання молока, хв;

40 – середній час зсідання молока під час виробництва сиру, хв;

A – наважка ферментного препарату, г.

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАТЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Наведіть принцип методу визначення молокозсідальної активності. До якого класу належить цей фермент?
2. Охарактеризуйте метод визначення активності ферменту та послідовність виконання аналізу.
3. Для яких груп живих організмів характерна наявність молокозсідальної активності? Яке значення мають ці ферменти у життєдіяльності?
4. Як використовуються ферменти молокозсідальної дії у практичній діяльності людини?
5. Який фермент молокозсідальної дії використовується під час виготовлення сиру?
6. Чим можна замінити сичужні ферменти тваринного походження?
7. Які переваги може мати використання протеолітичних сичужних ферментів, що продукуються вищими грибами?

РОБОТА 9.24. ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ХЛОРОФІЛАЗИ

Фермент хлорофілаза каталізує останню реакцію біосинтезу хлорофілу – приєднання фітолу до хлорофіліду з утворенням хлорофілу. Реакція може йти і у прямому, і у зворотному напрямку. В умовах *in vitro* хлорофілаза каталізує руйнування молекули хлорофілу.

Методи визначення активності ферменту ґрунтовані на визначенні кількості хлорофілу до та після дії ферменту. Про активність ферменту роблять висновок за збільшенням кількості хлорофіліду у зразку за визначений термін інкубації пігменту з препаратом ферменту.

Перебіг аналізу. Беруть дві наважки листя по 0,5 г, примішують у дві фарфорові ступки. Одну з наважок розтирають у присутності 80 % ацетону і CaCO_3 або MgCO_3 . Гомогенат переносять на скляний фільтр № 3 і фільтрують. Екстракцію пігментів проводять малими порціями 80 % ацетону до отримання перших крапель безбарвного фільтрату. Отриманий фільтрат переносять у мірчу колбу об'ємом 50 мл і доводять об'єм 80 % ацетоном до мітки.

У другій наважці (дослідній) визначають вміст хлорофілу після дії хлорофілази. Для цього наважку розтирають у ступці з 5 мл 60 % ацетону та невеликою кількістю CaCO_3 або MgCO_3 . Розтерту масу переносять на скляний фільтр № 3 і фільтрують. Екстракцію пігментів проводять декілька разів малими порціями 80 % ацетону до отримання безбарвного фільтрату, що витікає з фільтру. Отриманий фільтрат переносять у мірчу колбу і доводять об'єм фільтрату до 25 мл

60 % ацетоном. Екстракт пігментів інкубують за температури 23 °С протягом однієї години у темряві. Реакцію зупиняють, додаючи в екстракт 100 % ацетон із таким розрахунком, щоб концентрація ацетону в екстракті становила 80 %. Рідину фільтрують через скляний фільтр і доводять її об'єм у мірчій колбі 80 % ацетоном до 100 мл.

Кількість хлорофіліду в першому (контрольному) та другому (дослідному) екстрактах визначають за методом Веста та Мак-Кінні. Контрольний екстракт поділяють на дві частини по 25 мл. Першу частину залишають у темряві для визначення суми зелених пігментів, а у другій частині визначають вміст хлорофіліду. Для цього з екстракту за допомогою петролейного ефіру видаляють пігменти, що містять фітол. До 25 мл екстракту додають 2,5 мл 0,02 М NH_4OH і суміш переносять у ділільну лійку. У лійку додають 0,2 мл насиченого розчину хлориду натрію (NaCl) та 5 мл легкого петролейного ефіру (температура кипіння 40–60 °С). Суміш у лійці енергійно струшують декілька разів і залишають до розділення суміші на два шари. У петролейний ефір перейдуть хлорофіли та каротиноїди, а у водно-ацетоновому шарі залишаться хлорофіліди. Водно-ацетоновий шар зливають у чисту колбу, а фракцію петролейного ефіру відкидають. Водно-ацетонову фракцію знову переносять у ділільну лійку, наливають петролейний ефір до початкового об'єму і повторюють екстракцію пігментів, що містять фітол. Відмивання водно-ацетонавої фракції від жиророзчинних пігментів повторюють 3–4 рази. Після останнього промивання об'єм водно-ацетонowego екстракту доводять у мірчій колбі до 25 мл 80 % ацетоном.

Аналогічно виділяють хлорофілід і в дослідній витяжці. Беруть 25 мл екстракту після інкубації ферменту, додають 2,5 мл 0,02 М розчину аміаку (NH_4OH), переносять у ділільну лійку, додають 0,2 мл насиченого розчину хлориду натрію (NaCl) та 5 мл легкого петролейного ефіру. Суміш енергійно струшують декілька разів і залишають для відстоювання. Екстракцію хлорофілів, як і в попередньому випадку, повторюють 3–4 рази. Наприкінці об'єм водно-ацетонowego фільтрату доводять 80 % ацетоном до 25 мл.

Визначають оптичну густину отриманих витяжок на спектрофотометрі за довжини хвилі 652 нм. У першій контрольній витяжці визначають суму зелених пігментів та хлорофілідів. У другій контрольній витяжці та дослідній витяжці визначають хлорофілід. Концентрацію суми хлорофілів обчислюють за формулою Арнона (цит. за Гавриленко В. Ф. та ін., 1975):

$$C_{a+b} = \frac{D_{652} \times 1\,000}{34,5}.$$

Для обчислення концентрації хлорофіліду використовують ту саму формулу з коефіцієнтом 0,69:

$$C_{a+b} = \frac{D_{652} \times 1\,000}{34,5} \times 0,69.$$

Вміст суми зелених пігментів та хлорофілідів на 1 г сирого рослинного матеріалу розраховують за формулою:

$$A = \frac{C \times V}{n \times 1000} ,$$

де:

A – вміст пігментів у рослинному матеріалі, мг/г;

C – концентрація пігментів в екстракті, мг/1 000 мл;

V – об'єм витяжки пігментів, мл;

n – наважка рослинного матеріалу, г.

Про активність хлорофілази роблять висновок за кількістю хлорофіліду, який утворився в дослідній пробі після однієї години інкубації. Активність ферменту виражають у відсотках до загального вмісту зелених пігментів у контрольному варіанті. Для зручності результати заносять до таблиці.

Таблиця 7. Результати визначення активності хлорофілази

Варіант	Оптична густина розчину	Вміст пігментів у зразку		Активність ферменту, %
		мг	%	
Сума пігментів (хлорофіл + хлорофілід) у контролі				
Вміст хлорофіліду в контролі				
Вміст хлорофіліду в досліді				

Обладнання

1) дослідні рослини; 2) водяна баня з електричною плитою; 3) фільтрувальний папір; 4) фарфорові ступки з товчачиками; 5) фільтр Шотта № 3; 6) колба Бунзена; 7) колби конічні об'ємом 100 та 250 мл; 8) мірчі колби об'ємом 25 мл; 9) ділильні лійки об'ємом 100 мл; 10) піпетки об'ємом 1, 5 та 10 мл; 11) мірчі циліндри об'ємом 25 та 50 мл; 12) спектрофотометр.

Реактиви

1) розчин аміаку концентрований (NH₄OH); 2) петролейний ефір; 3) ацетон; 4) діетиловий ефір; 5) хлорид натрію (NaCl).

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Яку функцію виконує хлорофілаза?
2. У чому полягає принцип методу визначення активності хлорофілази?
3. Із якою метою для екстракції, пігментів у контрольному варіанті використовують 80 % ацетон, а в дослідному – 60 %?
4. Як обчислити кількість 100 % ацетону для інактивації ферменту?
5. Яких умов оточуючого середовища (рН, температура) потрібно дотримуватися для визначення активності ферменту?

6. Із якою метою водно-ацетонову витяжку пігментів обробляють петролейним ефіром?

7. У яких одиницях вимірюється активність хлорофілази? Кількість яких пігментів потрібно знати, щоб обчислити активність ферменту?

РОБОТА 9.25. ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ЛУЖНОЇ ТА КИСЛОЇ ФОСФАТАЗ

Лужні (КФ 3.1.3.1) і кислі (КФ 3.1.3.2) фосфатази, або фосформоноестерази, беруть участь у гідролізі ефірів ортофосфорної кислоти різних спиртів і фенолів. На відміну від деяких інших фосфатаз (5-нуклеотидази, фосфоамідази, аденозинтрифосфатази тощо), які гідролізують строго визначені субстрати, кисла і лужна фосфатази мають широку специфічність. Оптимальна дія лужної фосфатази проявляється за значень рН від 8,9 до 9,6, а кислої – від 4,5 до 5,3.

Принцип методу. Визначення активності лужних і кислотних фосфатаз ґрунтується на кількісному обліку неорганічного фосфору, що утворюється під час розпаду органічних сполук фосфору за строго визначених умов під впливом цих ферментів.

Перебіг аналізу. Для визначення активності кислотної фосфатази використовується боратний або гліколовий буферний розчин рН 5,3, а для лужної фосфатази – боратний буфер із рН 9,0. Наважку 3–5 г рослинної тканини (листя, стебла, коріння, насіння або інші частини рослини), подрібнюють у фарфоровій ступці з невеликою кількістю скляного піску і 5–10 мл відповідного буфера. Після цього суспензію переносять у мірчу колбу об'ємом 25 мл. Розчин кілька разів змивають невеликими порціями буфера, загальний об'єм у колбі доводять до 25 мл і вміст колби ретельно перемішують. Далі екстракт центрифугують протягом 5–10 хв за 3 000 об./хв. Супернатант використовують для визначення активності фосфатаз.

У мічу пробірку заливають 2 мл буфера з відповідним значенням рН, 0,2 мл розчину 0,001 М розчину $MgCl_2$ і 1 мл субстрату – гліцерофосфат натрію з концентрацією 5 мг у 1 мл. Далі у пробірку додають точно 2,5 мл ферментного препарату. Вміст пробірки перемішують, енергійно струшують і витримують у термостаті протягом 2 год за температури 35 °С. Після інкубації в суміш додають 3 мл 10 % трихлороцтової кислоти, щоб зупинити ферментативну реакцію і осадити білки. Загальний об'єм суміші доводять дистильованою водою до 10 мл і фільтрують через складений фільтр або центрифугують протягом 10 хв за 5 000 об./хв.

У розчині визначають вміст фосфору колориметричним методом із використанням аскорбінової кислоти. Для визначення береться 0,5 мл екстракту, що містить фосфор, додають 5 мл ацетатного буферного рН 4,0, 0,5 мл 1 % молібдату

амонію і 0,5 мл розчину аскорбінової кислоти. Загальний об'єм суміші становить 6,5 мл. Через 10 хв вимірюється оптична густина розчину на фотоелектроколометрі або спектрофотометрі за довжини хвилі 750 нм (червоний світлофільтр) з використанням кювет товщиною 10 мм.

Паралельно проводиться «холосте» визначення неорганічного фосфору. Для цього в реакційну суміш наливають трихлороцтову кислоту відразу після додавання ферментного препарату для інгібування ферменту. У зразку рослини неорганічний фосфор визначається двічі (кожен раз у 2–3 повтореннях): перший раз – відразу після припинення ферментативного розщеплення органічних фосфатів («холосте» визначення), другий – після двогодинної дії ферменту. Кількісна різниця між другим і першим визначеннями слугує мірою активності ферменту. Активність ферменту виражається в мг неорганічного фосфору (P_2O_5) на 1 г рослинної тканини. Активність ферменту розраховують за формулою:

$$A = \frac{V_1 \times 5 \times (a_1 - a_2)}{V_2 \times n},$$

де:

A – активність ферменту, мг P_2O_5 /г·год;

V_1 – об'єм екстракту, мл;

V_2 – об'єм ферментного препарату в інкубаційному середовищі, мл;

5 – відношення об'єму ферментного препарату в інкубаційній суміші та у кюветі для фотометрії;

a_1 – вміст неорганічного фосфору у дослідній пробі, мг;

a_2 – вміст неорганічного фосфору у «холостій» пробі.

Для обчислення кількості неорганічного фосфору у дослідних та «холостій» пробах застосовують калібрувальний графік, який будується за відомими концентраціями фосфату калію.

Побудова кривої калібрування

Готується стандартний розчин однозамінного фосфату калію, для чого в 1 л дистильованої води розчиняють 0,439 г KH_2PO_4 у присутності 20 мл 0,1 N H_2SO_4 . 1 мл цього розчину містить 0,1 мг фосфору. Стандартний розчин розводять у 4 рази (до 25 мл розчину фосфату в мірчій колбі на 100 мл додають дистильовану воду до мітки). Для побудови калібрувального графіка беруть проби фосфатних розчинів об'ємом від 0,05 до 0,5 мл. Об'єм ацетатного буфера рН 4,0 варіює від 5,45 до 5 мл, залежно від об'єму розчину фосфату (табл. 8). Далі додають 0,5 мл 1 % молібдату амонію і 0,5 мл розчину аскорбінової кислоти. Загальний об'єм суміші становить 6,5 мл. Через 10 хв вимірюється оптична густина розчину на спектрофотометрі або фотоелектроколометрі за довжини хвилі 750 нм (червоний світлофільтр) з використанням кювет з оптичним шляхом 10 мм.

Таблиця 8. Вимоги до ресурсів за компонентами

Номер пробірки	Концентрація розчину KH_2PO_4 , мкг/мл	Кількість розчину KH_2PO_4 , мл	Кількість ацетатного буфера, мл
1	12,5	0,05	5,45
2	25	0,1	5,4
3	50	0,2	5,3
4	75	0,3	5,2
5	100	0,4	5,1
6	125	0,5	5,0

Обладнання

1) центрифуга; 2) терморегулятор; 3) спектрофотометр або фотоелектроколориметр; 4) порцелянова ступка; 5) мірчі пробірки; 6) піпетки.

Реактиви

1) боратний буфер pH 9,0; 2) боратний буфер pH 5,3; 3) гліколевий буфер 0,1 N pH 9,0; 4) хлорид магнію (MgCl_2) 0,001 M розчин; 5) субстрат – розчин гліцерофосфату натрію в концентрації 5 мг в 1 мл; 6) трихлороцтова кислота 10 %; 7) фосфат калію однозаміщений (KH_2PO_4).

Приготування реактивів

Реактив № 1 (боратний буфер pH 9,0). 85,6 мл розчину тетраборату натрію 0,05 M (12,367 г H_3BO_3 + 100 мл розчину NaOH в 1 л) доводять до 100 мл 0,1 N соляною кислотою (HCl).

Реактив № 2 (боратний буфер pH 5,3). Доводять pH 0,05 M розчину тетраборату натрію до 5,3 0,1 N розчином соляної кислоти (HCl).

Реактив № 3 (0,1 N гліколевий буфер pH 9,0). Беруть 12,4 мл 0,1 N NaOH і доводять об'єм розчину до 100 мл 0,1 N розчином глікоколу (розчиняють 7,507 г глікоколу і 5,85 г NaCl та доводять об'єм розчину до 1 л).

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАТЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Охарактеризуйте фосфатази. Чим лужна та кисла фосфатази відрізняються від інших ферментів, що гідролізують ефірний зв'язок із залишком фосфорної кислоти?

2. У чому полягає принцип методу визначення активності лужної та кислої фосфатаз?

3. Наведіть методику підготовки дослідних зразків до визначення. Які субстрати застосовуються у роботі?

4. Як будується калібрувальний графік для визначення неорганічного фосфору?

5. Охарактеризуйте метод визначення неорганічного фосфору за допомогою аскорбінової кислоти.

РОБОТА 9.26. ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ПРОТЕЇНАЗИ У ПРОРОСТАЮЧОМУ НАСІННІ

Протеолітичні ферменти, протеази, пептидні гідролази – ферменти класу гідролаз; містяться в усіх живих організмах, каталізують гідроліз пептидних зв'язків у клітинних і харчових білках. Протеолітичні ферменти поділяються на пептидази (екзопептидази) і протеїнази (ендопептидази). Пептидази гідролізують в основному зовнішні пептидні зв'язки в білках і пептидах, протеїнази – внутрішні. Залежно від структурних особливостей активного центру протеолітичні ферменти поділяються на серин, тіол (цистеїн), кислі протеїнази і металоферменти, що містять атом металу (частіше Zn) в активному центрі. Протеїнази також відрізняються специфічністю субстрату, тобто здатністю гідролізувати зв'язки між певними амінокислотними залишками.

У рослин протеолітичні ферменти зустрічаються і у вегетативних органах (листі, стеблах, коренях), і в насінні, що знаходиться у стані спокою або проростання. Протеолітичні ферменти виконують різноманітні фізіологічні функції в рослинних організмах – від перетравлення резервних білків насіння до специфічних регуляторних процесів, як-от активація зимогенів, утворення гормонів та інших біологічно активних пептидів із їх попередників, транспортування білка, захисних реакцій.

Принцип методу. Основою для визначення загальної активності протеїназ є метод, розроблений Ансеном, і він полягає в тому, що ферментний препарат, виділений з рослинного матеріалу (сім'ядолей насіння гороху, квасолі або пророслих зерен пшениці і жита) діє на розчин будь-якого очищеного білка (казеїну, альбуміну, гемоглобіну). Активність ферментів визначається кількістю ароматичних амінокислот, що виділяються з білків (тирозин, триптофан) після видалення з розчину білків, які не прореагували з протеїназами ферментативного препарату.

Кількість ароматичних амінокислот, що містяться в білках, пептидах і у вільному стані, визначається фотометричним методом за допомогою реагенту Фоліна або на спектрофотометрі за 280 нм. Загальновизнано (з певною мірою умовності), що активність протеїназ пропорційна вмісту ароматичних амінокислот у розчині. Властивості білків, що лежать в основі цього методу, слугують хорошою ілюстрацією групової специфіки протеїназ, яка полягає в тому, що фермент каталізує розпад певних хімічних зв'язків в окремих групах близьких за структурою речовин (протеїнази рослин гідролізують і білки тваринного походження).

Перебіг аналізу. Для виділення протеїназ зважують 4–5 г сирих сім'ядолей або зерен (наважка сухого матеріалу приблизно 1 г), приміщують у ступку, додають трохи кварцового піску і ретельно подрібнюють. У ступку наливають 5 мл дистильованої води і продовжують подрібнення до отримання дрібнодисперсної

однорідної маси. Масу кількісно переносять у мірчу колбу на 50 мл, промиваючи товчачик і ступку невеликими порціями води. Об'єм рідини в колбі доводять до 50 мл, суспензію перемішують і залишають настоюватися протягом 1 год (періодично помішуючи) за 2–5 °С. Далі вміст колби переносять у центрифугальні пробірки (дві пробірки об'ємом по 20 мл), врівноважують їх і екстракт центрифугують протягом 30 хв за 8 000–10 000 g. Після цього супернатант переносять у чисту колбу (препарат протейнази) зі щільною пробкою і за необхідності ставлять у холодильник. Роботу з визначення активності протейназ краще проводити зі свіжим препаратом. Як субстрати для визначення активності рослинних протейназ використовуються 2 % розчини хімічно чистих казеїну, альбуміну або гемоглобіну.

Приготування розчину казеїну

Зважують 2 г порошку казеїну, приміщують у мірчу колбу на 100 мл, наливають невеликими порціями, прополоскавши стінки лійки і шийку колби, приблизно 80 мл 0,2 М фосфатного буфера з рН 8,0. Для розчинення казеїну колбу ставлять на водяну баню, розігріту до 30–40 °С. Після розчинення казеїну вміст колби доводять до 100 мл буферним розчином і ретельно перемішують. Перевіряють рН розчину і за необхідності доводять її до заданого значення додаванням кількох крапель 1 N NaOH або 1 N HCl. Враховується кількість витрачених лугу або кислоти, і відповідна їх кількість вноситься в розчин казеїну, що залишився в колбі. Розчин субстрату знову перемішують.

Приготування розчину гемоглобіну з рН 3,0

Зважують 2 г порошку гемоглобіну і приміщують у порцелянову ступку, куди доливають приблизно 10 мл води і обережно розтирають, стежачи за тим, щоб не було грудочок і частина білка не залишилася на стінках ступки і головці товчачика. Далі розчин кількісно переносять у склянку об'ємом 50 мл. Невеликими порціями води промивають ступку та товчачик. Розчин гемоглобіну у склянці підкислюють 0,3 N HCl до рН 3,0, кількісно переносять у мірчу колбу об'ємом 100 мл, доводять об'єм вмісту колби до мітки з водою і ретельно перемішують.

Приготування розчину гемоглобіну з рН 6,0

Приміщують 2,2 г порошку гемоглобіну в колбу об'ємом 150 мл і додають 100 мл 1/15 М фосфатного буфера з рН 6,0. Колбу щільно закривають пробкою і приміщують у ротатор для змішування і розчинення вмісту. Після розчинення гемоглобіну (через 15–20 хв) колбу знімають з ротатора, відкривають пробку, додають у розчин 36 г сечовини і залишають за кімнатної температури на 30–40 хв, періодично перемішуючи. Після розчинення сечовини у зразку перевіряють рН і за необхідності доводять до рН 6,0 розчинами 1 N NaH або 1 N HCl.

Для визначення активності протейнази у центрифугальні пробірки на 10 мл, пронумеровані за порядком, наливають 2 мл субстратів (казеїн з рН 8,0 або гемо-

глобін з рН 3,0 і рН 6,0), після чого пробірки ставлять на 1–2 хв у водяну баню, попередньо розігріту до 30 °С. Коли субстратний розчин набуває визначеної температури, у пробірці додають 2 мл ферментного препарату, отриманого з насіння тієї чи іншої культури. Реакція гідролізу білків проходить 30 хв за 30 °С. Щоб рівномірно нагріти вміст пробірки, її періодично обережно струшують. Через 30 хв дію протеїназ припиняють, додаючи в реакційну суміш 4 мл 10 % розчину трихлороцтової кислоти.

Паралельно готують контрольні проби, додаючи у них 2 мл відповідного розчину субстрату (розчини казеїну і гемоглобіну з різним рН) і примішують на водяну баню. Через 2 хв додають 2 мл ферментативного препарату, струшують і в кожну пробу додають 4 мл 10 % розчину трихлороцтової кислоти. Всі інші операції проводяться так само, як і в експериментальних варіантах.

Пробірки з експериментальними розчинами струшують і залишають на водяній бані ще на 30 хв для більш повного видалення білків, які не розклалися протеїназами. Пробірки знімають із водяної бані, акуратно протирають насухо і врівноважують на лабораторних терезах, додаючи за необхідності до більш легких краплями 5 % розчин трихлороцтової кислоти. Далі пробірки примішують у центрифугу і центрифугують 15 хв за 5 000 g, переносять у штатив і приступають до спектрофотометрії супернатанту. Паралельно визначається вміст білка в колбі, де знаходиться ферментний препарат (а також загальні білки в рослинному матеріалі). Вимірюється поглинання світла розчином субстрату на спектрофотометрі за довжини хвилі 280 нм.

Активність протеїназів (АП) в звичайних одиницях на 1 г насадки протягом 1 год розраховується за формулою:

$$A = \frac{E_c - E_e}{n \times 2},$$

де:

A – активність ферменту, ум. од.;

E_c – оптична густина контрольного зразка;

E_e – оптична густина дослідного зразка;

n – наважка рослинного матеріалу, що відповідає кількості ферментного препарату, взятого для визначення, г;

2 – коефіцієнт перерахунку на 1 год.

Обладнання

1) спектрофотометр; 2) центрифуга; 3) ротатор; 4) фарфорові ступки з товчачиками; 5) водяна баня; 6) мірчі колби ємністю 50 мл, 100 мл та 1 л; 7) конічні колби ємністю 100 мл; 8) лійки; 9) піпетки; 10) пробірки.

Реактиви

1) казеїн, гемоглобін або альбумін 2 % розчини; 2) фосфатний буфер 0,2 М рН 8,0; 3) фосфатний буфер 1/15 М рН 6,0; 4) соляна кислота (HCl) 0,3 N розчин;

5) гідроксид натрію (NaOH) 1 N розчин; 6) трихлороцтова кислота (ТХОК) 5 % і 10 % розчини; 7) соляна кислота (HCl) 1 N розчин; 8) сечовина.

Приготування реактивів

Реактив № 3 (1/15 М фосфатний буфер pH 6,0). Для приготування буферного розчину готують два розчини:

розчин А: 1/15 М $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – розчиняють 11,866 г двозаміщеного фосфату натрію у дистильованій воді і об'єм розчину доводять до 1 л;

розчин В: 1/15 М KH_2PO_4 – зважують 9,073 г однозаміщеного фосфату калію і розчиняють у дистильованій воді, об'єм розчину доводять до 1 л.

Буфер готується шляхом змішування 12,1 мл розчину А і 87,9 мл розчину В.

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАТЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Яку функцію виконують протеїнази?
2. Яке значення відіграють ці ферменти у рослинах?
3. Охарактеризуйте функції протеїназ у проростаючому насінні. У яких рослин слід очікувати максимальну активність ферментів у насінні?
4. Охарактеризуйте принцип методу визначення протеїназ у рослинах. Які субстрати застосовуються для визначення?
5. Наведіть послідовність виконання аналізу.

10. АНАЛІЗ ВІТАМІНІВ РОСЛИН

РОБОТА 10.1. ЯКІСНІ РЕАКЦІЇ НА ВІТАМІНИ

1. Якісні реакції на вітамін А

Принцип методу. Хлороформний розчин вітаміну А утворює з хлоридом сурми (III) продукт реакції, що забарвлений у синій колір. Із концентрованою сірчаною кислотою цей розчин дає продукт реакції червоно-бурого кольору.

Перебіг аналізу

1. Реакція з трихлористою сурмою. У суху пробірку вносять 3 краплі олійного розчину вітаміну А та додають 3 краплі хлороформного розчину хлориду сурми (III). Вміст пробірки перемішують. У пробірці спостерігається поява синього забарвлення, що поступово переходить у рожево-фіолетове.

2. Реакція з сірчаною кислотою (реакція Друммонда). У суху пробірку вносять 3 краплі олійного розчину вітаміну А та додають 1–2 мл хлороформу. Вміст пробірки перемішують та додають 5–6 крапель сірчаної кислоти. Вміст пробірки забарвлюється в червоно-бурій колір.

2. Якісні реакції на вітамін К

Принцип методу. Спиртовий розчин вітаміну К у лужному середовищі з діетилмалоновим ефіром дає червоно-фіолетове забарвлення, а у присутності діетилдітіокарбамату за цих умов утворює сполуку, забарвлену у блакитний колір. За наявності аніліну спиртовий розчин вітаміну К забарвлюється у червоний колір внаслідок утворення 1-метил-2-феніламінонафтохінону.

Перебіг аналізу

1. Реакція з діетилмалоновим ефіром. У пробірку з 2 мл спиртового розчину вітаміну К додають 0,5 мл розчину діетилмалонового ефіру та 0,1 мл розчину гідроксиду калію. Спостерігається поява червоно-фіолетового забарвлення.

2. Реакція з діетилдітіокарбаматом. У пробірку з 2 мл спиртового розчину вітаміну К додають 2 мл розчину діетилдітіокарбамату та 0,5 мл розчину гідроксиду натрію у етанолі. Розчин набуває блакитного забарвлення.

3. Реакція з аніліном. У пробірку з 1 мл спиртового розчину вікасолу додають 2 краплі аніліну. Після перемішування вміст пробірки забарвлюється в червоний колір.

3. Якісні реакції на вітамін Е

Принцип методу. Взаємодія α -токоферолу з концентрованою азотною кислотою зумовлює забарвлювання реакційної суміші в червоний колір. Це обумовлено тим, що продукт окислення α -токоферолу має хіноїдну структуру. Під час взаємодії з хлоридом заліза (III) α -токоферол окислюється до α -токоферилхінону – сполуки, забарвленої в червоний колір.

Перебіг аналізу

1. Реакція з азотною кислотою. У суху пробірку вносять 5 крапель спиртового розчину α -токоферолу та додають 1 мл концентрованої азотної кислоти. Пробірку інтенсивно струшують та спостерігають за появою червоного забарвлення.

2. Реакція з хлоридом заліза (III). У суху пробірку вносять 0,5 мл спиртового розчину α -токоферолу та 0,5 мл хлориду заліза (III). Вміст пробірки добре перемішують скляною паличкою. Спостерігається поява червоного забарвлення.

4. Реакція відновлення вітаміну B₂ (рибофлавіну)

Принцип методу. Водень, який утворюється під час додавання металічного цинку до концентрованої соляної кислоти, відновлює жовтий рибофлавін спочатку до родофлавіну (проміжної сполуки) червоного кольору, а далі до безбарвного лейкофлавіну.

Перебіг аналізу. У пробірку вносять 1 мл розчину вітаміну B₂, 0,5 мл концентрованої соляної кислоти та опускають у неї шматок металевого цинку. Водень, який виділяється під час реакції, реагує з рибофлавіном і відновлює його. Вміст пробірки поступово забарвлюється в рожевий колір, а надалі знебарвлюється. Під час збовтування знебарвленого розчину лейкофлавін знову окислюється киснем повітря в рибофлавін.

5. Якісні реакції на вітамін C

Принцип методу. Аскорбінова кислота здатна легко вступати в окисно-відновні реакції та відновлювати 2,6-дихлорфеноліндофенол, гексоціано-(III)-феррат калію, нітрат срібла, метиленовий синій. За таких умов окислена форма 2,6-дихлорфеноліндофенолу (синій колір) і метиленовий синій відновлюються в безбарвні лейкосполуки, а $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ відновлюється до $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, який із іонами тривалентного заліза дає сіль $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$ синього або зеленого забарвлення.

Перебіг аналізу

1. Реакція з 2,6-дихлорфеноліндофенолом. У пробірку вносять 0,5 мл розчину 2,6-дихлорфеноліндофенолу, 1–2 краплі розчину соляної кислоти та краплями розчин аскорбінової кислоти. Під час реакції розчин 2,6-дихлорфеноліндофенолу знебарвлюється.

2. Реакція з метиленовим синім. У дві пробірки вносять по одній краплі розчину метиленового синього та по одній краплі розчину карбонату натрію. У першу пробірку доливають 5 крапель розчину аскорбінової кислоти, у другу – 5 крапель води та обидві пробірки ставлять у термостат за температури 37–40 °С. Через деякий час рідина у пробірці з розчином аскорбінової кислоти знебарвиться.

3. Реакція з гексоціано-(III)-ферратом калію. До 1 мл розчину аскорбінової кислоти додати 1 мл розчину $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ та 0,5 мл розчину хлориду заліза (III). Спостерігається утворення синьо-зеленого забарвлення.

6. Якісні реакції на вітамін B₅ або PP

Принцип методу. Вітамін B₅ під час нагрівання з розчином ацетату міді утворює погано розчинний синій осад мідної солі. Цей вітамін також відновлює гідросульфід натрію з утворенням сполуки жовтого кольору. Під час нагрівання його з 2,4-динітрохлорбензолом у присутності луку утворюється забарвлена сполука.

Перебіг аналізу

1. Реакція з ацетатом міді. У пробірку вносять 5–10 мг вітаміну B₅ і розчиняють його під час нагрівання у 1–2 мл оцтової кислоти. До цього розчину, доведеного до кипіння, додають такий самий об'єм розчину ацетату міді. Рідина стає мутною та забарвлюється у блакитний колір. Після відстоювання випадає синій осад мідної солі нікотинової кислоти.

2. Реакція з гідросульфідом натрію. У пробірку вносять 5–10 мг вітаміну B₅, додають сюди 1,5 мл розчину карбонату натрію, перемішують та додають 1,5 мл свіжоприготованого розчину гідросульфід натрію. Рідина забарвлюється в жовтий колір.

3. Реакція з 2,4-динітрохлорбензолом. У фарфорову чашку для випарювання наливають 1 мл розчину нікотинової кислоти або нікотинамід у етанолі. Розчин випарюють досуха на водяній бані. До сухого залишку додають 1 мл розчину 2,4-динітрохлорбензолу у етанолі та добре перемішують скляною паличкою. Отриманий розчин знову випарюють на водяній бані досуха у витяжній шафі. Після цього ще продовжують нагрівання впродовж 10–15 хв. Чашку охолоджують до кімнатної температури та до осаду додають 5 мл розчину гідроксиду натрію у етанолі. З'являється червоне забарвлення, яке під час стояння суміші світлішає та поступово зникає.

Обладнання

1) штатив із пробірками; 2) піпетки градуйовані; 3) крапельниці; 4) скляні палички; 5) термостат; 6) терези технічні; 7) водяна баня; 8) фарфорова чашка; 9) годинник.

Реактиви

1) олійний розчин вітаміну A; 2) вітаміну K розчин у етанолі; 3) вітамін B₂ (завись рибофлавіну) 0,025 % розчин; 4) аскорбінова кислота 0,4 % розчин; 5) порошок вітаміну B₅; 6) нікотинова кислота або нікотинамід 0,1 % розчин у етанолі; 7) дистильована вода; 8) хлороформ; 9) хлорид сурми (III) (SbCl₃) 33 % хлороформний розчин; 10) концентрована сірчана кислота; 11) вікасол 0,05 % розчин у етанолі; 12) діетилмалоновий ефір 1 % розчин; 13) гідроксид калію (KOH) 1 % розчин; 14) діетилдітіокарбамат 5 % розчин; 15) гідроксид натрію (NaOH) 4 % розчин у етанолі; 16) розчин аніліну; 17) концентрована соляна кислота; 18) металічний цинк; 19) 2,6-дихлорфеноліндофенол 0,1 % розчин; 20) соляна кислота

(HCl) 10 % розчин; 21) метиленовий синій 0,01 % розчин; 22) карбонат натрію (Na_2CO_3) 10 % розчин; 23) гексоціано-(III)-феррат калію ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) 1 % розчин; 24) хлорид заліза (III) (FeCl_3) 1 % розчин; 25) оцтова кислота (CH_3COOH) 10 % розчин; 26) ацетату міді ($(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Cu}$) 5 % розчин; 27) гідросульфід натрію (NaHSO_3) 5 % розчин; 28) 2,4-динітрохлорбензол 1 % розчин у етанолі.

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Поняття про вітаміни, їх класифікація.
2. Загальна біохімічна та фізіологічна роль вітамінів. Вітаміни як кофери-менти.
3. Поширення та форми знаходження вітамінів у рослинах.
4. Загальна характеристика жиророзчинних вітамінів (хімічна будова, біохімічна роль, поширення в рослинах).
5. Загальна характеристика водорозчинних вітамінів (хімічна будова, біохімічна роль, поширення в рослинах).
6. Наведіть характеристику якісних реакцій на окремі вітаміни.

РОБОТА 10.2. ВИЗНАЧЕННЯ ПРОВІТАМІНУ А (КАРОТИНУ)

У рослинних організмах вітаміну А не виявлено, але у їх тканинах знаходиться каротин (провітамін А), з якого в організмах тварин утворюється вітамін А. Каротин ($\text{C}_{40}\text{H}_{56}$) не розчиняється у воді і погано розчиняється у спирті, але добре розчиняється у хлороформі, ефірі, ацетоні, бензині. Каротин нестійкий до дії кисню повітря та світла.

Перебіг аналізу. Беруть наважку (5–20 г) свіжого рослинного матеріалу, подрібнюють і розтирають її у фарфоровій ступці з кварцовим піском або товченим склом. У зв'язку з тим, що каротин нестійкий у кислому середовищі, до наважки рослинного матеріалу під час розтирання додають карбонат натрію (Na_2CO_3) для нейтралізації кислот. Для екстрагування пігментів у ступку додають 10 мл ацетону і знову розтирають до гомогенного стану. Гомогенат переносять на фільтр Шотта, з'єднаний із колбою Бунзена, і фільтрують витяжку. Ступку та рослинний матеріал промивають невеликими порціями ацетону до зникнення забарвлення фільтрату. Ацетоновий екстракт переносять у ділильну лійку, додають 10–20 мл бензину і суміш ретельно перемішують. Ацетон із суміші видаляють водою, яку додають малими порціями в ділильну лійку. Ділильну лійку злегка струшують і залишають на декілька хвилин для розділення шарів рідини. Нижній шар, який містить ацетон із водою та зелені пігменти, зливають, а бензиновий розчин ще декілька разів промивають водою.

Отриманий вільний від ацетону бензиновий розчин каротину відстоюють або фільтрують через безводний сульфат натрію для остаточного видалення во-

ди. Розчин використовують для визначення каротину та інших пігментів методом хроматографічної адсорбції. Замість бензину можна використовувати петролейний ефір.

Приготування хроматографічної колонки

Хроматографічна колонка – це скляна трубка з відтягнутим кінцем, який має кран або затиск. Довжина трубки повинна становити 30–40 см, діаметр – 1,5–2 см. Із цією метою зручно використовувати обрізану бюретку для титрування об'ємом 50–100 мл. На дно хроматографічної трубки щільно вставляють ватяний тампон товщиною приблизно 1 см, який перешкоджає проходженню адсорбенту у приймальну посудину. Далі колонку заповнюють сорбентом (Al_2O_3). Заповнення ведуть невеликими порціями, постійно ущільнюючи адсорбент у трубці скляною паличкою. Товщина шару адсорбенту в колонці повинна становити 5–7 см.

Проведення хроматографії каротину

Бензиновий розчин пігментів пропускають через колонку з адсорбентом. Для цього колонку приєднують до колби Бунзена, з'єднану з насосом Камовського, і повільно відкачують повітря. Треба постійно стежити, щоб поверхня сорбенту була покрита шаром бензину (інакше може відбуватися окислення каротину повітрям). Далі рідину з колби зливають, а колонку промивають чистим бензином до тих пір, поки весь каротин не перейде у приймальну посудину (колбу Бунзена). Каротин адсорбується оксидом алюмінію слабше за інші пігменти і тому легше вимивається. Промивання проводять до зникнення жовтого забарвлення бензину, який витікає з колонки.

Бензиновий розчин каротину переносять у мірчу колбу об'ємом 50 або 100 мл і доводять об'єм розчину бензином до мітки, перемішують і вимірюють оптичну густину на фотоелектроколориметрі за синім світлофільтром у кюветах товщиною 5 або 10 мм.

Кількісний вміст каротину у дослідному матеріалі обчислюють за допомогою даних калібрувального графіка за такою формулою:

$$X = \frac{A \times V \times 100}{n},$$

де:

X – вміст каротину в рослинному матеріалі, мг/100 г;

A – концентрація каротину, знайдена за калібрувальним графіком, мг;

V – загальний об'єм екстракту, який отримано з наважки рослинного матеріалу, мл;

n – наважка рослинного матеріалу, г;

100 – коефіцієнт для перерахунку на 100 г рослинної речовини.

Побудова калібрувального графіка

Перший спосіб. Готують стандартний розчин, для чого 0,145 г перекристалізованого азобензолу розчиняють у 100 мл 96 % етанолу. У 1 мл стандартного розчину міститься 1,45 мг азобензолу, що відповідає за забарвлення концентрації α - або β -каротину 0,00235 мг/мл. Для побудови калібрувального графіка у першу пробірку наливають 1 мл стандартного розчину, у другу – 2, у третю – 3, у четверту – 4, у п'яту – 5 мл. В усіх пробірках об'єм розчину доводять етанолом до 10 мл, ретельно перемішують і вимірюють оптичну густину на фотоелектроколориметрі за синім світлофільтром у кюветах завтовшки 5 або 10 мм (кювети повинні бути ті самі, що і в досліді). Контрольним розчином слугує етанол. На основі отриманих результатів будують калібрувальний графік, відкладаючи на осі абсцис концентрацію каротину у мкг/мл, а на осі ординат – оптичну густину розчинів.

Другий спосіб. Готують стандартний розчин біхромату калію, для чого розчиняють 290 мг солі у воді і доводять об'єм розчину до 1 л. Цей розчин за оптичною густиною відповідає концентрації каротину 2,35 мкг/мл. Для побудови калібрувального графіка готують серію розбавлених розчинів. Для цього у пробірки наливають 2, 4, 6, 8 та 10 мл вихідного розчину та доводять об'єм розчинів у пробірках до 10 мл. Вимірюють оптичну густину розчинів та будують калібрувальний графік.

Обладнання

1) фарфорова ступка з товчачиком; 2) кварцовий пісок або товчене скло; 3) колба Бунзена з фільтром Шотта; 4) насос Камовського; 5) ділильна лійка; 6) хроматографічна колонка; 7) пробірки; 8) фотоелектроколориметр; 9) міліметровий папір.

Реактиви

1) бензин або петролейний ефір; 2) етанол; 3) ацетон; 4) карбонат натрію (Na_2CO_3); 5) сульфат натрію безводний (Na_2SO_4); 6) оксид алюмінію для хроматографії (Al_2O_3); 7) азобензол перекристалізований; 8) біхромат калію ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$).

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАТЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Які вітаміни належать до групи жиророзчинних? Яке їх значення?
2. Яке значення має каротин у життєдіяльності рослин? Як із цього пігменту утворюється вітамін А та його значення?
3. Дайте характеристику методу визначення вмісту каротину в рослинах.
4. Як очистити каротин від речовин, які заважають визначенню?
5. У чому полягає принцип методу хроматографії? Як проводиться адсорбційна хроматографія у цій роботі?
6. Як будується калібрувальний графік? Як обчислюється концентрація каротину для побудови калібрувального графіка?

РОБОТА 10.3. КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ВІТАМІНУ С ЗА ТІЛЬМАНСОМ

Принцип методу. Метод кількісного визначення аскорбінової кислоти ґрунтується на її здатності окислюватися 2,6-дихлорфеноліндофенолом до дегідро-аскорбінової кислоти. За об'ємом 2,6-дихлорфеноліндофенолу, витраченого на титрування, визначають вміст аскорбінової кислоти в досліджуваному матеріалі. Як тільки весь вміст вітаміну С окислиться, розчин, який титрується, у кислому середовищі набуває рожевого забарвлення внаслідок утворення недисоційованих молекул 2,6-дихлорфеноліндофенолу. У лужному середовищі 2,6-дихлорфеноліндофенол має синє забарвлення, у кислому – червоне, а під час відновлення знебарвлюється.

Перебіг аналізу. Зважують 1 г рослинного матеріалу, ретельно розтирають його у фарфоровій ступці зі скляним піском. До розтертої маси додають 9 мл 2 % розчину соляної кислоти та відстоюють. Через 10 хв вміст перемішують та фільтрують. Для кількісного визначення беруть 3 мл фільтрату, приміщують його в конічну колбу та титрують розчином натрієвої солі 2,6-дихлорфеноліндофенолу до появи рожевого забарвлення, що не зникає впродовж 30 сек 1 мл 0,0005 моль/л розчину натрієвої солі 2,6-дихлорфеноліндофенолу відповідає 0,088 мг аскорбінової кислоти.

Масову частку аскорбінової кислоти розраховують за формулою:

$$X = \frac{E \times V \times V_0}{V_1 \times n},$$

де:

X – вміст аскорбінової кислоти, %;

E – маса аскорбінової кислоти (0,088 мг), яка еквівалентна 1 мл 0,0005 моль/л розчину натрієвої солі 2,6-дихлорфеноліндофенолу;

V – об'єм 0,0005 моль/л розчину натрієвої солі 2,6-дихлорфеноліндофенолу, витраченого на титрування, мл;

V_0 – загальний об'єм екстракту, мл;

V_1 – об'єм екстракту, взятого для титрування, мл;

n – маса рослинної наважки, мг.

Обладнання

1) терези технікохімічні; 2) фарфорова ступка з товчачиком; 3) конічні колби на 50 мл; 4) мікробюретка; 5) піпетки градуйовані; 6) лійка; 7) фільтр; 8) скляні палички; 9) скляний пісок; 10) годинник.

Реактиви

1) соляна кислота (HCl) 2 % розчин; 2) 0,0005 моль/л розчин натрієвої солі 2,6-дихлорфеноліндофенолу (молекулярна маса – 290, еквівалентна маса – 145).

РОБОТА 10.4. КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ВІТАМІНУ С У РОСЛИННОМУ МАТЕРІАЛІ

Принцип методу. Вміст вітаміну С у досліджуваному матеріалі визначають титриметричним методом за допомогою титрованого розчину 2,6-дихлорфеноліндофенолу. Цим методом визначають тільки відновлену форму аскорбінової кислоти. Для того, щоб вітамін С не руйнувався у процесі досліді, титрування проводять у кислому середовищі.

Перебіг аналізу. Матеріал для дослідження (картопля, морква, капуста, шипшина тощо) нарізають дрібними шматочками. Зважують 10 г рослинного матеріалу та переносять у ступку, де його розтирають із невеликою кількістю кварцового піску, потроху додаючи 5 % розчин соляної кислоти до одержання рідкої кашки. Отриману масу переносять у мірчу колбу на 100 мл. Ступку та товчачик ретельно обмивають 5 % розчином НСІ, яку зливають у ту саму мірчу колбу. Усього повинно бути витрачено приблизно 40–50 мл НСІ. Після цього вміст колби доводять до мітки дистильованою водою, перемішують і фільтрують через складчастий фільтр або центрифугують.

У конічну колбу на 50 мл вносять мірчою піпеткою 10 мл отриманого екстракту та титрують із мікробюретки розчином 2,6-дихлорфеноліндофенолу до появи слабкого рожевого забарвлення. Визначають об'єм 2,6-дихлорфеноліндофенолу, який пішов на титрування. Титрування проводять не менше трьох разів, після чого визначають середній об'єм 2,6-дихлорфеноліндофенолу, що використали для розрахунку вмісту вітаміну С. Кількість вітаміну С обчислюють за формулою:

$$X = \frac{100 \times T \times V \times V_1}{n \times V_2},$$

де:

X – вміст аскорбінової кислоти, мг на 100 г досліджуваного рослинного матеріалу;

T – титр 2,6-дихлорфеноліндофенолу, мг аскорбінової кислоти;

V – загальний об'єм приготованого екстракту, мл;

V₁ – об'єм 2,6-дихлорфеноліндофенолу, витрачений на титрування, мл;

V₂ – об'єм екстракту рослинного матеріалу, взятого на титрування, мл;

n – наважка рослинного матеріалу, г.

Обладнання

1) фарфорова ступка з товчачиком; 2) мірчі колби об'ємом 100 мл; 3) конічні колби об'ємом 50 мл; 4) піпетки градуйовані об'ємом 10 мл; 5) мікробюретки.

Реактиви

1) соляна кислота (НСІ) 5 % розчин; 2) розчин 2,6-дихлорфеноліндофенолу 0,001 N.

Приготування реактивів

Реактив № 2. 0,001 N розчин 2,6-дихлорфеноліндофенолу: зважують 1,45 г 2,6-дихлорфеноліндофенолу, розчиняють у дистильованій воді і доводять об'єм розчину дистильованою водою до 1 л. Далі визначають титр розчину барвника.

Визначення титру розчину 2,6-дихлорфеноліндофенолу

Для встановлення титру 2,6-дихлорфеноліндофенолу 2 мл 0,1 % розчину аскорбінової кислоти розчиняють у 50 мл 2 % розчину сірчаної кислоти. Далі 5 мл отриманого розчину вносять у колбу для титрування та титрують його приготуванням розчином 2,6-дихлорфеноліндофенолу до появи рожевого забарвлення. Визначають об'єм барвника, який витрачено на титрування.

Далі беруть такий самий об'єм аскорбінової кислоти (5 мл), додають у нього кілька кристалів (не більше 0,1 г) йодиду калію, 5 крапель 1 % розчину крохмалю та титрують із іншої мікробюретки 0,001 N розчином йодату калію. Титрування ведуть до появи ледь помітного синього забарвлення та визначають об'єм розчину, який витрачено на титрування.

Оскільки титруються однакові об'єми аскорбінової кислоти, кількості йодату калію та 2,6-дихлорфеноліндофенолу, витрачені на титрування, еквівалентні одна одній. Оскільки 1 мл 0,001 N розчину йодату калію еквівалентний 0,088 мг аскорбінової кислоти, титр розчину 2,6-дихлорфеноліндофенолу (у мг аскорбінової кислоти) визначається за формулою:

$$T = \frac{0,088 \times V_1}{V_2},$$

де:

V_1 – об'єм 2,6-дихлорфеноліндофенолу, який витрачено на титрування, мл;

V_2 – об'єм йодату калію, який витрачено на титрування, мл.

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ (ДО РОБІТ 10.3 ТА 10.4)

1. Наведіть характеристику аскорбінової кислоти (вітаміну С). У яких реакціях бере участь ця речовина?
2. Яке значення вітамін С має у життєдіяльності рослин?
3. Дайте характеристику титриметричного визначення кількості аскорбінової кислоти у рослинах.
4. Навіщо потрібно визначати титр барвника? Як це робиться?

РОБОТА 10.5. КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ АСКОРБІНОВОЇ КИСЛОТИ КОЛОРИМЕТРИЧНИМ МЕТОДОМ ЗА Г. Н. ЧУПАХІНОЮ

Принцип методу. Під час кількісного визначення аскорбінової кислоти в рослинах методом титрування витяжок 2,6-дихлорфеноліндофенолом виникає

ють труднощі, пов'язані з визначенням закінчення титрування. У реакції з аскорбіною кислотою барвник, який має синій колір, відновлюється у безбарвну сполуку. На окислення однієї молекули аскорбінової кислоти витрачається 2 молекули барвника. Надлишок барвника у кислому середовищі має рожевий колір, який і вказує на закінчення титрування. Але забарвлення розчину нестабільне і швидко зникає. Через це результат титрування багато в чому залежить від швидкості титрування та освітлення робочого місця.

Метод, який запропонувала Г. Н. Чупахіна, оснований на фотометричному визначенні надлишку 2,6-дихлорфеноліндофенолу після відновлення певної його частини аскорбіною кислотою. Оптична густина забарвленого розчину вимірюється точно через 35 с після додавання в рослинну витяжку барвника, що дає можливість повністю виключити похибки, які виникають під час визначення аскорбінової кислоти методом титрування.

Перебіг аналізу. Береться наважка рослинного матеріалу вагою приблизно 2 г. Наважка подрібнюється ножицями з нержавіючої сталі (інші метали можуть викликати руйнування аскорбінової кислоти). Подрібнений матеріал заливають 10 мл 2 % метафосфornoї кислоти і швидко розтирають у фарфоровій ступці. Гомогенат кількісно переносять у мірчу колбу об'ємом 100 мл і його об'єм доводять до мітки 2 % розчином метафосфornoї кислоти (метафосфорна кислота використовується для стабілізації аскорбінової кислоти, а також для осадження білків). Вміст колби струшують та фільтрують або центрифугують. Із фільтрату беруть три проби по 10 мл і додають до них по 1 мл 0,025 % розчину 2,6-дихлорфеноліндофенолу. Як тільки до проби додано барвник, вмикають секундомір, витяжка і барвник ретельно перемішуються і суміш переноситься у кювету для фотоелектроколориметра з оптичним шляхом 10 мм. Фотоелектроколориметр настраюють за 2 % розчином метафосфornoї кислоти і контрольна кювета замінюється дослідною. Під час колориметрування стрілку гальванометра постійно підводять до нульової відмітки протягом 35 с. Після цього терміну проводиться відлік оптичної густини розчину. Для визначення оптичної густини застосовують зелений світлофільтр. Для контролю вимірюють оптичну густина суміші, яка складається з 10 мл 2 % розчину метафосфornoї кислоти та 1 мл барвника. Зміни забарвлення дослідного розчину пропорційні вмісту аскорбінової кислоти у рослинному матеріалі. Для обчислення результатів використовують різницю між оптичною густиною контрольного та дослідного зразка. Вміст аскорбінової кислоти розраховують за допомогою калібрувального графіка. Якщо рослинна тканина містить велику кількість аскорбінової кислоти (700 мг/г і більше), весь барвник вступає у реакцію і знебарвлюється. У такому разі треба розвести витяжку метафосфornoю кислотою у 2 рази (10 мл витяжки та 10 мл 2 % метафосфornoї кислоти) і додати 2 мл барвника.

Побудова калібрувального графіка

Для побудови калібрувального графіка 100 мг аскорбінової кислоти розчиняють в 1 л 2 % метафосфорної кислоти. Беруть 1, 2, 3, 4, 5, 6 та 7 мл зразкового розчину і розводять у мірчих колбах до 100 мл 2 % розчином метафосфорної кислоти. Отримані розчини містять відповідно 1, 2, 3, 4, 5, 6 та 7 мкг аскорбінової кислоти у 1 мл. Далі беруть по 10 мл розчинів аскорбінової кислоти та по 1 мл барвника і визначають оптичну густину цих розчинів точно через 35 с після додавання барвника (як і в досліді). Паралельно визначають оптичну густину суміші 10 мл 2 % розчину метафосфорної кислоти та 1 мл 2,6-дихлорфеноліндофенолу. Обчислюють різницю між оптичною густиною розчинів, які містять аскорбінову кислоту, та контрольного розчину, і ці дані використовують для побудови калібрувального графіка, відкладаючи їх на осі абсцис.

Вміст аскорбінової кислоти в рослинній тканині обчислюється за формулою:

$$X = \frac{A \times V}{n},$$

де:

X – вміст аскорбінової кислоти в рослинній тканині, мкг/г;

A – вміст аскорбінової кислоти, який знайдено за калібрувальним графіком, мкг;

V – об'єм екстракту, який отримано з наважки рослинного матеріалу, мл;

n – наважка рослинного матеріалу, г.

Обладнання

1) ножиці з нержавіючої сталі; 2) фарфорова ступка з товкачиком; 3) паперові фільтри; 4) центрифуга та центрифугальні пробірки; 5) мірчі циліндри об'ємом 25 мл; 6) піпетки об'ємом 1 та 5 мл; 7) конічні колби об'ємом 100 мл; 8) фотоелектроколориметр та кювети до нього; 9) міліметровий папір.

Реактиви

1) метафосфорна кислота (HPO_2) 2 % розчин; 2) 0,025 % розчин 2,6-дихлорфеноліндофенолу; 3) гідроксид натрію (NaOH) або гідроксид калію (KOH) 0,01 N розчин.

Приготування реактивів

Реактив № 2 (0,025 % розчин 2,6-дихлорфеноліндофенолу). 0,0625 г барвника 2,6-дихлорфеноліндофенолу примішують у мірчу колбу об'ємом 250 мл і додають 150–200 мл дистильованої води та 6 крапель 0,01 N розчину гідроксиду натрію або калію. Вміст колби струшують протягом 10–15 хв до повного розчинення барвника. Після набуття розчином кімнатної температури його об'єм доводять дистильованою водою до 250 мл та ретельно перемішують.

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАЇ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Які речовини називають вітамінами? Яке їх значення в життєдіяльності рослин?
2. Які вітаміни належать до групи водорозчинних? Яке їх значення у біохімічних перетвореннях?
3. Яка хімічна будова та властивості аскорбінової кислоти? У яких реакціях у рослинних клітинах бере участь аскорбінова кислота?
4. Дайте характеристику принципу колориметричного методу визначення кількості аскорбінової кислоти у рослинах. Чому наважку рослинного матеріалу треба подрібнювати інструментом із нержавіючої сталі?
5. Як будується калібрувальний графік для визначення аскорбінової кислоти?
6. Як обчислюється вміст аскорбінової кислоти? Чому для обчислень застосовується різниця між контрольним та дослідним вимірами оптичної густини?
7. Порівняйте титриметричні та колориметричний метод визначення кількості аскорбінової кислоти у рослинах.

РОБОТА 10.6. КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ВІТАМІНУ Р У РОСЛИНАХ ЗА ЛЕВЕНТАЛЕМ

Принцип методу. До речовин, які мають Р-вітамінну активність, належать насамперед рутин і гесперидин. Подібну активність проявляють катехіни та таніни чайного листка. У рослинах ці сполуки беруть участь в окисно-відновних процесах. За своєю природою рутин є глікозидом, який складається із залишків рамнози, β-глюкози та флавонону кверцитину. Крім чайного листка, рутин у незначній кількості міститься в бутонах і квітах софори японської, а також у листках і квітах різних видів гречки.

Метод кількісного визначення рутину ґрунтується на його здатності окислюватися перманганатом калію; як індикатор використовують індигокармін, який вступає в реакцію з KMnO_4 після того, як окислиться весь рутин. Експериментально встановлено, що 1 мл 0,02 моль/л розчину перманганату калію окислює 6,4 мкг рутину.

Перебіг аналізу. Наважку чаю або листя інших рослин масою 100 мг примішують у колбу, заливають 50 мл гарячої дистильованої води та кип'ятять впродовж 5 хв. Отриманий екстракт охолоджують, відбирають 10 мл та переносять в іншу колбу або хімічну склянку, куди доливають ще 10 мл дистильованої води та 5 крапель індигокарміну (з'являється синє забарвлення). Ретельно перемішуючи рідину в колбі, вміст її титрують розчином KMnO_4 до появи стійкого жовтого забарвлення. Паралельно проводять титрування контрольного розчину, де замість екстракту в колбу вносять 10 мл дистильованої води. Різниця між дослід-

ним і контрольним титруванням – це число мілілітрів 0,01 моль/л розчину KMnO_4 , що витратився на окислення рутину.

Вміст вітаміну Р розрахувати за формулою:

$$X = \frac{q \times V \times V_0}{V_1 \times n},$$

де:

X – вміст вітаміну Р у рослині, мкг;

q – стандартний перерахунковий коефіцієнт титрування (3,2);

V – об'єм 0,01 моль/л розчину KMnO_4 , витраченого на титрування, мл;

V_0 – об'єм вихідного розчину, в якому розчинено взяту для аналізу наважку, мл;

V_1 – об'єм розчину, взятого для титрування, мл;

n – маса сухої речовини, взятої для аналізу, г.

Обладнання

1) терези технічні; 2) мікробюретка; 3) крапельниця; 4) піпетки градуйовані; 5) хімічні склянки або колби; 6) годинник; 7) електрична плита.

Реактиви

1) перманганат калію (KMnO_4) 0,01 моль/л розчин; 2) індикатор індігокармін; 3) дистильована вода.

Приготування реактивів

Реактив № 2 (розчин індикатору). 1 г індігокарміну розтирають у фарфоровій ступці, розчиняють у 50 мл концентрованої сірчаної кислоти та доводять дистильованою водою до об'єму 1 л. Отриманий розчин фільтрують та зберігають у темній посудині.

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Наведіть характеристику вітаміну Р. До якої групи вітамінів він належить?
2. Які функції у рослинних клітинах виконує рутин (вітамін Р)? Які рослини містять найбільшу кількість цього вітаміну?
3. Дайте характеристику методики визначення рутину. На чому ґрунтується цей метод?

РОБОТА 10.7. ВИЗНАЧЕННЯ РУТИНУ (ВІТАМІНУ Р)

Принцип методу. Метод оснований на здатності рутину утворювати кольорові розчини з цитратно-боратною сумішшю. Інтенсивність забарвлення у певних межах пропорційна концентрації рутину. Оптична густина досліджуваних кольорових розчинів, що містять рутин, порівнюється з оптичною густиною стандартного розчину рутину.

Перебіг аналізу. Наважку рослинного матеріалу (5 г листя або 10 мг дрібно перемеленого насіння) розтирають у фарфоровій ступці і багаторазово екстрагують гарячим розчином метанолу до отримання безбарвного екстракту. Екстракти зливаються разом, спирт переганяють у спеціальному пристрої під вакуумом або випаровують на водяній бані за температури 35 °С у потоці повітря. Залишок обробляють кілька разів невеликими порціями етилового ефіру для видалення кольорових пігментів. Ефірні екстракти зливаються через фільтр на невеликій воронці Бюхнера і відкидають. Рутин, що міститься в осаді, розчиняють у метанолі або абсолютному етанолі з легким нагріванням на водяній бані і фільтрують через той самий фільтр через лійку Бюхнера до чистого приймача.

2 мл розчину рутину переносять у пробірку ємністю 10 мл з притертою пробкою, додають 8 мл цитратно-боратної суміші і залишають на 10 хв. Оптичну густину визначають на спектрофотометрі або фотоелектроколориметрі за довжини хвилі 420 нм у кюветах з оптичним шляхом 1 см. Вміст рутину визначають за допомогою порівняння з оптичною густиною розчину зразка, що містить 0,1 мг рутину в 1 мл. Для цього до 2 мл стандартного розчину додається 8 мл цитратно-боратної суміші, після чого проводиться визначення оптичної густини стандарту, як описано вище.

Вміст рутину розраховується за формулою:

$$X = \frac{D_1 \times C \times v \times 100}{D_2 \times n \times 2},$$

де:

X – вміст рутину, мг на 100 г речовини;

D₁ – оптична густина зразка;

D₂ – оптична густина стандарту;

C – вміст рутину у стандартному розчині;

v – розведення;

n – наважка рослинного матеріалу, г.

Обладнання

1) фотоелектроколориметр або спектрофотометр; 2) фарфорові ступки; 3) конічні колби ємністю 100 мл; 4) пристрій для дистиляції спирту у вакуумі; 5) водяна баня; 6) колба Бунзена; 7) лійки Бюхнера; 8) мірчі пробірки об'ємом 10 і 20 мл; 9) мірчі піпетки; 10) фарфорові чашки.

Реактиви

1) метанол; 2) абсолютний етанол; 3) сухий ацетон; 4) цитратно-боратна суміш; 5) стандартний розчин рутину.

Приготування реактивів

Реактив № 4 (цитратно-боратна суміш). Для отримання суміші готують два розчини.

Реагент А: 10 г цитратної кислоти, попередньо висушений протягом 2 год за 60 °С, розчиняють у 100 мл сухого ацетону.

Реагент В: 0,8 г борної кислоти розчиняють у 100 мл сухого ацетону.

Перед застосуванням реагенти А і В змішують у пропорції 1 : 1 і фільтрують.

Реактив № 5 (стандартний розчин рутину). 0,0250 г рутину розчиняють у 10 мл гарячого метанолу і доводять до 250 мл сухим ацетоном. Розчин зберігається в темній пляшці з притертою пробкою за 5 °С. Реагент може зберігатися протягом 6 місяців.

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАТЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Наведіть характеристику вітаміну Р. До якої групи вітамінів він належить?
2. Які функції у рослинних клітинах виконує рутин (вітамін Р)? Які рослини містять найбільшу кількість цього вітаміну?
3. Дайте характеристику методики визначення рутину. На чому ґрунтується цей метод?

РОБОТА 10.8. ВИЗНАЧЕННЯ НІКОТИНОВОЇ КИСЛОТИ (ВІТАМІН РР)

Нікотинова кислота (вітамін РР) міститься в усіх органах рослин і накопичується у значних кількостях у насінні. Перетворюючись в амід, він використовується для формування великої групи окисно-відновних ферментів, що містять НАД і НАДФ у їх активних групах. Біологічну активність має і вільна нікотинова кислота, і її амід. В організмі людини нікотинова кислота не синтезується. Нікотинова кислота добре розчиняється у воді і низці інших розчинників. Це досить стійка сполука, не руйнується під впливом високих температур і окисників.

Принцип методу. Визначення кількості вітаміну ґрунтовано на здатності нікотинової кислоти утворювати кольорові сполуки з бромистим роданом і метанолом. У модифікації Е. М. Степанової застосовується порівняння оптичної густини дослідного розчину з відповідним показником стандарту.

Перебіг аналізу. 2–10 г рослинного матеріалу, зваженого на аналітичних терезах, розтирають невеликою кількістю 2 N сірчаної кислоти і кількісно переносять у мірчу колбу об'ємом 50 мл. Колбу тримають на киплячій водяній бані 1,5 год, періодично мішаючи. Під час цього гідролізується більшість складних органічних речовин. Після завершення гідролізу колби охолоджують, об'єм рідини доводять до мітки дистильованою водою і екстракт фільтрують. Далі беруть 25 мл фільтрату в мірчу колбу ємністю 50 мл і нейтралізують у присутності фенолфталеїну 10 N NaOH до злегка рожевого забарвлення. Надлишок лугу швидко усувають додаванням 5 N сірчаної кислоти. У отриманий розчин додають 2 мл 80 % сульфату цинку і кілька крапель етанолу. Далі додають у розчин

4 N NaOH до появи осаду та блідо-рожевого забарвлення, перемішують, залишають на 10 хв і доводять до об'єму до 50 мл. Осад фільтрують і фільтрат використовують для аналізу.

У конічні колби об'ємом 50 мл з притертою пробкою (або широкогорлі пробірки такого самого об'єму) додають у першу – 5 мл дослідного розчину, а в інші 5 мл стандартного розчину нікотинової кислоти, який містить 0,005 мг речовини в 1 мл. Колби нагрівають на водній бані протягом 5 хв за 50 °С і під тягою з бюретки додають по 2 мл роданобромідного реактиву. Вміст перемішують і нагрівають на водяній бані протягом 10 хв за 50 °С. Після швидкого охолодження колби приміщують на 10 хв у темряву, далі доливають 3 мл метолу і залишають у темряві на 1 год. Оптична густина досліджуваного і стандартного розчинів визначається на фотоелектроколометрі або спектрофотометрі за довжини хвилі 440 нм у кюветах з оптичним шляхом 1 см.

Паралельно проводиться контрольне визначення оптичної густини речовин, які містять аміногрупи, що викликають забарвлення вихідного розчину і реагентів. Для цього у першому випадку замість роданобромідного реагенту використовується 2 мл води, а в другому розчин нікотинової кислоти замінюється водою. Розрахунок результатів проводиться за такою формулою:

$$X = \frac{(D_1 - D_3) \times c \times V \times 100}{(D_2 - D_4) \times n},$$

де:

X – вміст нікотинової кислоти у пробі;

D_1 – оптична густина досліджуваного розчину;

D_2 – оптична густина стандартного розчину нікотинової кислоти;

D_3 – оптична густина амінофарбувальних речовин у вихідному розчині (для корекції для реактивних речовин);

D_4 – оптична густина для корекції реактивів;

c – вміст нікотинової кислоти у стандартному розчині, мг;

n – наважка рослинного матеріалу, г;

V – об'єм витяжки (з урахуванням усіх розведень), мл.

Обладнання

1) фотоелектроколориметр або спектрофотометр; 2) водяна баня; 3) термометри; 4) фарфорові ступки; 5) колби об'ємом 50 мл; 6) піпетки; 7) бюретки; 8) конічні колби з притертою пробкою об'ємом 50 мл або широкогорлі мірчі пробірки такого самого об'єму.

Реактиви

1) сірчана кислота (H_2SO_4) 2 N та 5 N розчини; 2) гідроксид натрію (NaOH) 4 N та 10 N розчин; 3) сульфат цинку ($ZnSO_4$) 80 % розчин; 4) роданобромідний

реактив; 5) метол перекристалізований; 6) стандартний розчин нікотинової кислоти.

Приготування реактивів

Реактив № 4 (роданобромідний реактив). Беруть 4 мл бром у і додають до 100 мл воду, струшують суміш, декантують і охолоджують, занурюючи колбу з розчином у лід. До охолодженої бромної води додають краплями 10 % розчин роданіду калію або амонію до блідо-жовтого кольору. Розчин остаточно знебарвлюють додаванням 1 % розчину роданіду калію або амонію. Далі до розчину невеликими порціями додають 2–50 мг карбонату кальцію (CaCO_3) до припинення виділення діоксиду вуглецю (CO_2) і утворення осаду. Розчин фільтрують і зберігають у темній пляшці з притертою пробкою на холоді. Розчин придатний лише протягом дня приготування.

Реактив № 5 (метол перекристалізований). 100 г метолу змішують з 0,7 г бісульфіту натрію, додаючи до суміші 500 мл 0,1 N H_2SO_4 , розігрітої до кипіння і за необхідності – 100 г активованого вугілля. Суміш фільтрують через лійку Бюхнера у велику хімічну склянку, додають 0,3 г бісульфіту натрію та 700 мл етанолу і приміщують на кілька годин у крижану ванну в темряві. За цих умов випадають кристали метолу, які промивають 95 % етанолом та висушують на повітрі у темряві. Метол зберігають у темній посудині з притертою пробкою. 8 % розчин метолу у 0,5 N соляній кислоті (HCl) готується в день аналізу.

Реактив № 6 (стандартний розчин нікотинової кислоти). 0,500 г речовини розчиняють у колбі об'ємом 500 мл у воді, підкислений 5 мл 10 N сірчаної кислоти (H_2SO_4). За умови зберігання в темній пляшці з притертою пробкою на холоді розчин придатний протягом 6 міс. У день аналізу готують робочий стандартний розчин. Для цього беруть 5 мл вихідного розчину і доводять його об'єм у мірчій колбі дистильованою водою до 1 л. 1 мл розчину містить 0,005 мг нікотинової кислоти.

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАТЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Наведіть характеристику вітаміну РР. До якої групи вітамінів він належить?
2. Які функції у рослинних клітинах виконує нікотинова кислота (вітамін РР)? Які рослини містять найбільшу кількість цього вітаміну?
3. Дайте характеристику методики визначення нікотинової кислоти. На чому ґрунтується цей метод?
4. Охарактеризуйте порядок проведення аналізу.

11. АНАЛІЗ НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ РОСЛИН

РОБОТА 11.1. ЯКІСНІ РЕАКЦІЇ НА НУКЛЕОПРОТЕЇДИ

Принцип методу. Нуклеопротеїди виділяють із рослинного матеріалу, гідролізують їх та проводять якісні реакції на білки, вуглеводи (рибозу та дезоксирибозу), пуринові азотисті основи та фосфор.

Перебіг аналізу. Для одержання рибонуклеопротеїдів приміщують у ступку 10 г дріжджів. Додають туди 4 мл водно-ефірної суміші (1 : 1) і перемішують. Далі додають 5 г кварцового піску та ретельно розтирають, доливаючи невеликими порціями 50 мл 0,4 % розчину гідроксиду натрію (NaOH). Отриману масу розтирають не менше 15 хв, після чого суспензію фільтрують через паперовий фільтр або центрифугують. Отриманий осад викидають, а весь фільтрат (центрифугат) збирають, приміщують у склянку і потроху додають 10 % розчин оцтової кислоти (приблизно 5–6 мл). Після кожного додавання лакмусовим папірцем перевіряють реакцію середовища. Кислоту додають доти, поки середовище не стане слабкокислим. За цих умов нуклеопротеїди випадають в осад. Отриману суспензію центрифугують, фільтрат зливають і відокремлюють осад нуклеопротеїдів.

Отриманий осад нуклеопротеїдів переносять у колбу для гідролізу та додають туди 20 мл 10 % сірчаної кислоти. Колбу закривають пробкою, до якої приєднано зворотний повітряний холодильник, і нагрівають (слабко кип'ятять) на водяній купальній бані (або на сітці) протягом 1 год. Після цього гідролізат фільтрують і проводять якісні реакції на наявність продуктів гідролізу.

Визначення білків і пептидів

Під час проведення гідролізу за умов, зазначених вище, білки піддаються йому лише частково та розщеплюються тільки до пептидів. Білки і пептиди в гідролізаті виявляють за допомогою біуретової реакції. Для цього беруть пробірку та вносять у неї 10 крапель отриманого розчину гідролізату, додають 10 крапель 10 % розчину NaOH та 2 краплі 1 % розчину сульфату міді (CuSO_4). Усе ретельно перемішують, спостерігають за зміною кольорів (з'являється рожеве або рожево-фіолетове забарвлення).

Відкриття пуринових основ

У пробірку наливають 10 крапель гідролізату і обережно, краплями, додають концентрований розчин аміаку до лужної реакції за лакмусом, а далі вносять 8–10 крапель аміачного розчину нітрату срібла. Через кілька хвилин випадає пластівчастий світло-коричневий осад солей пуринових основ.

Відкриття пентоз

Виявлення пентоз ґрунтується на їх дегідратації концентрованими кислотами з утворенням фурфуролу, що дає з тимолом (реакція Моліша), α -нафтолом

та орцином забарвлені сполуки (*ці реакції проводять тільки в сухих пробірках*). Рибозу та дезоксирибозу можна виявити реакцією з дифеніламіном, який з рибозою дає зелене забарвлення, а з дезоксирибозою – синє.

Реакція Моліша. У пробірку наливають 10 крапель гідролізату, додають 2–3 краплі 1 % спиртового розчину тимолу та добре перемішують. Далі обережно, по стінці пробірки, нашаровуючи, доливають 10–15 крапель концентрованої сірчаної кислоти. З’являється червоне забарвлення, що найкраще виражене на границі розділення рідин.

Реакція з α -нафтолом. У пробірку наливають 10 крапель гідролізату, додають 1–2 краплі 0,1 % розчину α -нафтолу і добре перемішують. Далі обережно, по стінці пробірки, доливають 10–15 крапель концентрованої сірчаної кислоти. Під час відстоювання на границі розділу двох фаз з’являється фіолетове забарвлення.

Реакція з орцином. У пробірку наливають 10 крапель гідролізату, додають 10–15 крапель орцину та 15–20 крапель концентрованої соляної кислоти. Суміш нагрівають до кипіння і спостерігають появу забарвлення (зеленого або рожево-червоного).

Відкриття рибози та дезоксирибози. У пробірку наливають 5 крапель гідролізату, додають 15–20 крапель 1 % розчину дифеніламіну та кип’ятять на водяній бані. Через 15–20 хв кипіння в пробірці з’являється синьо-зелене забарвлення.

Виявлення фосфорної кислоти

У пробірку наливають 10 крапель гідролізату, додають 20 крапель розчину молібдату амонію в азотній кислоті та кип’ятять на водяній бані. Рідина в пробірці забарвлюється у лимонно-жовтий колір. Пробірку дістають із бані та відразу охолоджують у потоці холодної води. Утворюється жовтий осад фосфоромолібдату амонію $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{MoO}_3$:



Можна також виявити залишки фосфорної кислоти у такий спосіб. У пробірку наливають 10 крапель гідролізату і поступово додають концентрований розчин аміаку до появи різкого запаху, а після цього 10 крапель магnezіальної суміші. Утвориться кристалічний осад фосфату магнію-амонію MgNH_4PO_4 .

Обладнання

1) фарфорова ступка з товчачиком; 2) центрифуга; 3) центрифугальні пробірки; 4) пробірки для проведення якісних реакцій.

Реактиви

1) дистильована вода; 2) діетиловий ефір; 3) гідроксид натрію (NaOH) 0,4 % розчин; 4) оцтова кислота (CH_3COOH) 10 % розчин; 5) сірчана кислота (H_2SO_4)

10 % розчин; 6) сульфат міді ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 1 % розчин; 7) нітрат срібла (AgNO_3) аміачний розчин; 8) тимол; 9) α -нафтол; 10) концентрована сірчана кислота (H_2SO_4); 11) концентрована соляна кислота (HCl); 12) орцин; 13) молібдат амонію ($(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$) 10 % розчин; 14) дифеніламін.

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Які речовини називаються нуклеопротейдами?
2. У який спосіб зв'язуються полімерні ланцюги нуклеопротейдів?
3. Яку роль відіграють нуклеопротейди у біохімічних процесах обміну речовин?
4. Які способи виділення нуклеопротейдів існують і на чому вони основані?
5. Які продукти гідролітичного розпаду нуклеопротейдів?
6. За допомогою яких зв'язків з'єднані нуклеотиди у нуклеїновій кислоті?
7. Що є структурною одиницею нуклеїнових кислот і які компоненти входять у цю сполуку?
8. Які основи входять до складу нуклеотидів?
9. Які цукри входять до складу нуклеотидів?
10. За допомогою яких зв'язків з'єднані у нуклеотидах основа та цукор, цукор та фосфорна кислота?
11. Які нуклеїнові кислоти входять до складу живих організмів? Який їх хімічний склад?
12. За допомогою яких якісних реакцій виявляють продукти гідролітичного розпаду нуклеопротейдів: білки та пептиди; пуринові основи; пентози; фосфорну кислоту?

РОБОТА 11.2. ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ РНК ТА ДНК В РОСЛИНАХ

Принцип методу. ДНК та РНК мають велике значення в життєдіяльності рослин. ДНК (дезоксирибонуклеїнова кислота) є носієм генетичної інформації і міститься у органοїдах, наприклад, у ядрі, пластидах та мітохондріях. РНК (рибонуклеїнова кислота) бере участь у синтезі білка і міститься практично в усіх органοїдах та утвореннях клітини.

Для кількісного визначення груп фосфорорганічних сполук застосовують різні розчинники та осаджувачі, які дають змогу розділити їх. У рослинах містяться дуже активні фосфатази, які можуть викликати значний гідроліз фосфорних ефірів і призвести до похибок під час визначення їх кількості. Тому необхідно швидко інактивувати ці ферменти обробкою киплячим етанолом або гарячою водяною парою.

Перебіг аналізу. На аналітичних терезах зважують з точністю до 0,01 г 1,5 г подрібненого рослинного матеріалу і примішують у пробірку. Для інактивації

ферментів у рослинному матеріалі його обробляють гарячим етанолом. Для цього у пробірку доливають 8 мл 80 % етанолу, занурюють пробірку у киплячу водяну баню та кип'ятять протягом 2 хв. Далі пробірку охолоджують, зафіксований рослинний матеріал переносять у фарфорову ступку і розтирають до гомогенного стану у присутності 5 мл 1 % розчину оцтової кислоти. Гомогенат кількісно переносять у центрифугальну пробірку, змиваючи ступку 2 рази 1 % розчином оцтової кислоти порціями по 5 мл. Вміст колби перемішують скляною паличкою та настоюють протягом 10 хв, періодично мішаючи. Далі екстракт центрифугують за 3 000–4 000 об./хв упродовж 5 хв. Надосадову рідину зливають, а до осаду знову додають 5 мл 3 % розчину оцтової кислоти, перемішують протягом 5 хв та центрифугують. Промивання осаду оцтовою кислотою повторюють ще один раз, використовуючи 5 мл 10 % розчину оцтової кислоти. Далі осад двічі промивають ацетоном, додаючи кожного разу по 5 мл, перемішуючи і центрифугуючи за 3 000–4 000 об./хв упродовж 5 хв. Осад тричі промивають 5 мл суміші етилового спирту та етилового ефіру (1 : 1) і центрифугують. Надосадову рідину відкидають, а осад промивають один раз порцією 5–10 мл 50 % етанолу для видалення залишків ефіру. Після центрифугування до осаду додають 10 мл 10 % розчину хлориду натрію, який містить 0,5 % цитрату натрію. Пробірку закривають лійкою, приміщують у киплячу воду і витримують протягом 20 хв, періодично мішаючи скляною паличкою. Після охолодження гомогенат центрифугують і надосадову рідину зливають у мірчу колбу об'ємом 25 мл. Осад, який залишився у пробірці, ще 2 рази промивають розчином, для чого до осаду кожного разу додають 8 мл 10 % розчину хлориду натрію, перемішують і нагрівають у киплячій воді протягом 20 хв. Надосадову рідину після центрифугування переносять у мірчу колбу, об'єднуючи з попередніми порціями. Об'єм рідини у колбі доводять до 25 мл і перемішують. В отриманому розчині визначають вміст нуклеїнових кислот.

Визначення РНК

Беруть 6 мл розчину нуклеїнових кислот у хлориді натрію у центрифугальну пробірку, додають 0,5 мл 1 N розчину гідроксиду натрію і 1 краплю фенолфталеїну. Далі краплями додають 10 % розчин сульфату цинку до знебарвлення індикатора, розчин перемішують та центрифугують протягом 5 хв за 3 000 об./хв. Розчин відкидають, а осад, який містить РНК, промивають, додаючи 3 мл 1 % розчину ацетату цинку. Після центрифугування та видалення розчину до осаду додають 1 краплю насиченого розчину хлориду заліза, перемішують скляною паличкою, промивають 3 мл 70 % етанолу, змиваючи розчин із палички. Рідину струшують протягом 3 хв, центрифугують і зливають розчин (останні краплі видаляють, торкаючись рідини фільтрувальним папером). До осаду у пробірці додають 1,5 мл 0,4 N розчину гідроксиду натрію, який містить 2 % хлориду натрію,

перемішують скляною паличкою протягом 5 хв і центрифугують. Розчин РНК зливають у чисту суху пробірку. Із осаду РНК екстрагують ще 1 раз, додаючи до нього ще 1,5 мл розчину гідроксиду натрію, який містить хлорид натрію, і повторюючи попередні операції. Екстракти об'єднують, перемішують і беруть для визначення РНК 1 мл цього розчину в суху чисту пробірку. До розчину РНК додають 4 мл орцинового реактиву, закривають лійкою і нагрівають у киплячій водяній бані протягом 15 хв. Розчин охолоджують, вимірюють його об'єм, розводять дистильованою водою до 5 мл і визначають оптичну густину на фотоелектроколориметрі за довжини хвилі 610–660 нм в кюветі товщиною 10 мм. Як контроль використовують орциновий реактив. Концентрацію РНК знаходять за калібрувальним графіком і обчислюють вміст у рослинному матеріалі за формулою:

$$X = \frac{0,1 \times 25 \times 3 \times 5 \times C}{6 \times n} = \frac{6,25 \times C}{n},$$

де:

X – вміст РНК в дослідному матеріалі, мг/100 г;

25 – загальний об'єм дослідного розчину, мл;

6 – об'єм дослідного розчину, який взято для визначення РНК, мл;

5 – об'єм розчину, який колориметрується, мл;

3 – об'єм розчину РНК, який отримано після розчинення в розчині гідроксиду натрію, мл;

C – концентрація РНК, знайдена за калібрувальним графіком, мкг/мл;

0,1 – коефіцієнт перерахунку мікрограмів у міліграми у 100 г речовини;

n – наважка рослинного матеріалу, г.

Побудова калібрувального графіка для визначення РНК

У чисті сухі пробірки примішують 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,6, 0,8 та 1 мл стандартного розчину, який містить 0,5 мг РНК в 1 мл, додають до 1 мл 0,4 N розчин гідроксиду натрію. Далі в усі пробірки доливають по 4 мл орцинового реактиву і пробірки нагрівають на киплячій водяній бані протягом 15 хв. Після охолодження об'єм розчину у пробірках доводять дистильованою водою до 5 мл та вимірюють оптичну густину розчинів на фотоелектроколориметрі за 610–660 нм у кюветах завтовшки 10 мм проти розчину, який містить 4 мл орцинового реактиву та 3 мл дистильованої води. Використовуючи отримані дані, будують калібрувальний графік. На осі абсцис відкладають концентрацію РНК, а на осі ординат – оптичну густину.

Визначення ДНК

Беруть 10 мл розчину нуклеїнових кислот у хлористому натрії, примішують у центрифугальну пробірку, додають 1 мл 1 N розчину гідроксиду натрію, 1 краплю фенолфталейну та нейтралізують 10 % розчином сірчанокислого цинку до знебарвлення індикатора. Розчин перемішують і залишають на 5 хв. Далі розчин

центрифугують і 1 раз промивають 3 % розчином сірчаноокислого цинку. Після центрифугування до осаду, який містить ДНК, додають 0,4 мл 20 % розчину оцтової кислоти, перемішують скляною паличкою до розчинення осаду і додають для осадження ДНК 4 мл 95 % етанолу (для уникнення втрат ДНК спиртом промивають і скляну паличку). Вміст пробірки струшують і залишають на 5 хв для повного осадження. Рідину центрифугують, надосадову рідину відкидають, а осад промивають 3 мл 70 % етанолу. Осад висушують, занурюючи пробірки у воду з температурою 80–100 °С, та охолоджують. До сухого осаду додають 2 мл 5 % розчину хлорної кислоти, перемішують та гідролізують ДНК. Для цього у пробірку додають гарячу дистильовану воду (температура повинна становити 90 °С) і витримують протягом 15 хв. Розчин охолоджують, додають 0,1 мл каталізатора, 4 мл дифеніламінового реактиву, вимірюють об'єм і доводять його до 6 мл 5 % розчином хлорної кислоти. Після перемішування осад відділяють центрифугуванням, прозорий розчин переносять у суху пробірку, яку залишають за температури 30 °С на 6 год або за кімнатної температури (18–20 °С) на ніч. Інтенсивність забарвлення розчину вимірюють на фотоелектроколориметрі за червоним світлофільтром (600–610 нм) у кюветі товщиною 10 мм. Контрольним розчином слугує суміш дистильованої води (2 мл) та 4 мл дифеніламінового реактиву. Обчислення вмісту ДНК у рослинному матеріалі проводять за допомогою калібрувального графіка за формулою:

$$X = \frac{0,1 \times 25 \times 6 \times C}{10 \times n} = \frac{1,5 \times C}{n},$$

де:

X – вміст ДНК у дослідному рослинному матеріалі, мг/100 г;

25 – загальний об'єм витяжки, який отримано з дослідного рослинного матеріалу, мл;

10 – об'єм дослідного розчину, який взято для визначення ДНК, мл;

6 – об'єм розчину, який колориметрується, мл;

C – концентрація ДНК в розчині, знайдена за калібрувальним графіком, мкг/мл;

0,1 – коефіцієнт перерахунку мікрограмів у міліграми у 100 г речовини;

n – наважка рослинного матеріалу, г.

Побудова калібрувального графіка для визначення ДНК

Для приготування шкали у чисті сухі пробірки наливають 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,2, 1,6 та 2 мл стандартного розчину, який містить 0,24 мг ДНК у 1 мл розчину, та розводять до 2 мл 5 % розчином хлорної кислоти. В одну з пробірок (контрольний розчин) наливають 2 мл 5 % розчину хлорної кислоти. Далі в усі пробірки наливають по 0,1 мл каталізатора і по 4 мл дифеніламінового реактиву, перемішують та приміщують у воду з температурою 30 °С на 6 год або на ніч за тем-

ператури 18–20 °С. Після цього вимірюють оптичну густину розчинів за довжини хвилі 600–610 нм (червоний світлофільтр) у кюветах з довжиною оптичного шляху 10 мм. Як розчин порівняння використовують контрольний розчин.

Отримані дані є основою для побудови калібрувального графіка. На осі абсцис відкладають концентрацію ДНК, а на осі ординат – оптичну густину розчинів.

Обладнання

1) фарфорова ступка з товкачиком; 2) пробірки; 3) електрична плита; 4) водяна баня; 5) центрифуга з центрифугальними пробірками; 6) скляні палички; 7) скляні лійки; 8) фотоелектроколориметр; 9) мірчі колби об'ємом 25 мл; 10) фільтрувальний папір; 11) міліметровий папір.

Реактиви

1) етанол 95 %, 70 % та 50 % розчини; 2) етиловий ефір; 3) ацетон; 4) оцтова кислота (CH_3COOH) 1 %, 10 % та 20 % розчини; 5) хлорид натрію (NaCl) 10 % розчин, який містить 2 % цитрату натрію; 6) фенолфталеїн 0,1 % розчин у 60 % етанолі; 7) сірчаноокислий цинк (ZnSO_4) 10 % розчин; 8) хлорид заліза (FeCl_3) насичений розчин; 9) гідроксид натрію (NaOH) 0,4 N розчин, який містить 2 % хлориду натрію (NaCl); 10) хлорна кислота (HClO_4) 5 % розчин; 11) стандартний розчин РНК; 12) стандартний розчин ДНК; 13) орциновий реактив; 14) дифеніламіновий реактив; 15) розчин каталізатора.

Приготування реактивів

Реактив № 5 (10 % розчин хлориду натрію, який містить 2 % цитрату натрію). Беруть 50 г хлориду натрію ч. д. а. та 2,5 г тризаміщеного цитрату натрію, розчиняють у дистильованій воді і доводять об'єм розчину до 500 мл.

Реактив № 9 (0,4 N розчин гідроксиду натрію з хлоридом натрію). 16 г гідроксиду натрію та 20 г хлориду натрію х. ч. розчиняють у дистильованій воді та доводять об'єм розчину до 1 л. Зберігають у щільно закритій пляшці.

Реактив № 11 (стандартний розчин РНК). Зважують на аналітичних терезах 0,0125 г очищеного сухого препарату РНК, розчиняють у 10 мл 0,4 N розчину гідроксиду натрію, який містить хлорид натрію, і переносять у мірчу колбу об'ємом 25 мл. Залишки розчину РНК змивають розчином гідроксиду натрію і цим самим розчином доводять об'єм стандартного розчину РНК до 25 мл. 1 мл цього розчину містить 0,5 мг РНК. Замість РНК можна приготувати стандартний розчин рибози. Для цього зважують 0,1000 г рибози, розчиняють у дистильованій воді у мірчій колбі об'ємом 100 мл, доводять водою до мітки та ретельно перемішують. Для побудови калібрувального графіка цей розчин розводять водою в 10 разів, що відповідає вмісту рибози 0,1 мг/мл (у перерахунку на РНК 0,5 мг/мл). Подальше використання розчину рибози таке саме, як і розчину препарату РНК.

Очистка препарату РНК. 0,05 г препарату РНК, який надходить у продаж, приміщують у центрифугальну пробірку, додають 3 мл 1 % розчину оцтової кислоти, перемішують і центрифугують. Розчин оцтової кислоти видаляють і осад РНК ще раз промивають 1 % оцтовою кислотою. Після центрифугування розчин оцтової кислоти видаляють якомога повніше, а до осаду додають 4 мл 10 % розчину хлориду натрію, який містить цитрат натрію. Пробірку приміщують у гарячу воду з температурою 80 °С, перемішують скляною паличкою до повного розчинення осаду. Далі розчин швидко охолоджують, занурюючи пробірку у холодну воду, додають 0,2 мл 5 % розчину хлорної кислоти, струшують і центрифугують. Каламутний розчин зливають у чисту центрифугальну пробірку. До нього додають 10 мл 95 % етанолу, дають осісти осаду РНК протягом 10 хв і центрифугують. Осад у пробірці послідовно промивають тричі 70 % етанолом (по 3 мл кожного разу) і 95 % етанолом. Осад висушують, занурюючи пробірку у воду з температурою 80 °С. Сухий препарат переносять у пробірку, закривають пробкою і зберігають у темному прохолодному місці.

Реактив № 12 (стандартний розчин ДНК). Зважують на аналітичних терезах 0,0120 г чистого препарату ДНК, переносять у пробірку, додають 10 мл 5 % розчину хлорної кислоти і нагрівають у гарячій воді з температурою 90 °С протягом 15 хв. Розчин охолоджують, переносять у мірчу колбу об'ємом 50 мл, розводять 5 % хлорною кислотою до мітки і перемішують. 1 мл отриманого розчину містить 0,24 мг ДНК. Очистку препарату ДНК, який надходить у продаж, проводять аналогічно очистці препарату РНК.

Реактив № 13 (орциновий реактив). 0,2 г орцину розчиняють у 100 мл соляної кислоти, розведеної дистильованою водою у співвідношенні 7 : 3. До отриманого розчину додають 2 краплі насиченого розчину хлориду заліза (FeCl_3). Зберігають у темному місці.

Реактив № 14 (дифеніламінний реактив). 1,5 г дифеніламіну ч. д. а. розчиняють у 100 мл перегнаної концентрованої оцтової кислоти та додають 0,5 мл сірчанної кислоти густиною 1,84. Розчин перемішують і зберігають у темній пляшці у холодному місці.

Реактив № 15 (розчин каталізатора). До 5 мл 0,1 % розчину сульфату міді ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) додають 0,2 мл 16 % розчину оцтового альдегіду та перемішують. Розчин зберігається 1 тиждень. Для приготування 16 % розчину оцтового альдегіду ампулу, в якій знаходиться 160 г альдегіду, охолоджують у воді з льодом. Охолоджену ампулу струшують і додають її вміст до 600 мл охолодженої льодом дистильованої води. Об'єм розчину доводять дистильованою водою до 1 л і перемішують. Розчин зберігається у добре закритій пляшці у темному прохолодному місці.

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Значення нуклеїнових кислот у життєдіяльності рослин.
2. Яка будова РНК та ДНК? Їх відмінність.
3. Які види РНК ви знаєте? Які їх функції?
4. Які сполуки називають нуклеозидом, нуклеотидом, полінуклеотидом? За допомогою яких зв'язків утворюються полінуклеотиди?
5. Охарактеризуйте правила Чаргаффа.
6. Як визначається вміст РНК в рослинній тканині?
7. Як визначити вміст ДНК?
8. Які речовини можуть заважати визначенню нуклеїнових кислот? Як їх позбутися?
9. Як будуються калібрувальні графіки для визначення РНК та ДНК?

РОБОТА 11.3. КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ДНК РЕАКЦІЄЮ З ДИФЕНІЛАМІНОМ ЗА ДИШЕ

Принцип методу. Для визначення нуклеїнових кислот використовують кольорові реакції на рибозу та дезоксирибозу. Найпоширенішою кольоровою реакцією на ДНК є реакція з дифеніламіном.

Перебіг аналізу. 3 мг препарату ДНК приміщують у пробірку зі зворотним холодильником, доливають 5 мл 5 % розчину трихлороцтової кислоти та нагрівають протягом 15 хв за 90 °С. Отриманий гідролізат фільтрують. Якщо фільтрат мутний, фільтрують для повної прозорості через сухий азбест, приміщений у лійку зі скляною пористою пластинкою. Із фільтрату беруть піпеткою 1 мл розчину і додають подвійний об'єм розчину дифеніламіну. Суміш нагрівають на киплячій водяній бані 10 хв. Рідина забарвлюється у синій колір. Після охолодження вимірюють оптичну густину розчину на фотоелектроколориметрі із червоним світлофільтром у кюветі з оптичним шляхом 5 мм. Вміст ДНК визначають за стандартною кривою.

Побудова калібрувального графіка

Стандартну криву будують після проведення наведеної вище кольорової реакції з гідролізатами ДНК відомої концентрації. 90–100 мг ДНК розчиняють у 50 мл 0,01 н розчину гідроксиду натрію. Концентрацію ДНК визначають спектрофотометричним методом, для чого 1,0 мл вихідного розчину гідролізують у 20 мл 0,5 N розчину хлорної кислоти протягом 30 хв на киплячій водяній бані і визначають оптичну густину гідролізату за 270 та 290 нм.

$$C_{DNA} = \frac{(E_{270} - E_{290}) \times 10,1}{0,19},$$

де:

C_{DNA} – концентрація ДНК, мкг/л;

E_{270} – оптична густина гідролізату за 270 нм;

E_{290} – оптична густина гідролізату за 290 нм.

Для визначення концентрації ДНК в 1 мл вихідного розчину отримане значення концентрації необхідно помножити на величину розведення, тобто у цьому випадку на 20. Із вихідного розчину готують 3 серії розчинів ДНК із концентраціями 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500 мкг/мл.

Обладнання

1) спектрофотометр або фотоелектроколориметр; 2) водяна баня; 3) скляні хімічні пробірки; 4) скляні трубки; 5) піпетки градуйовані на 1, 2 та 5 мл.

Реактиви

1) препарат ДНК; 2) трихлороцтова кислота (CCl_3COOH) 5 % розчин; 3) дифеніламін; 4) хлорна кислота ($HClO_4$) 0,5 N розчин; 5) гідроксид натрію ($NaOH$) 0,01 N розчин.

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАТЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Наведіть характеристику принципу методу визначення ДНК за реакцією з дифеніламіном.
2. Із якими компонентами нуклеїнових кислот реагує дифеніламін?
3. Які речовини можуть заважати визначенню ДНК?
4. Як будується калібрувальний графік? Як визначити концентрацію ДНК для його побудови?

РОБОТА 11.4. ОТРИМАННЯ ПРЕПАРАТІВ РОСЛИННОЇ ДНК

Отримання високоочищених нативних нуклеїнових кислот є першим необхідним етапом у більшості молекулярно-біологічних досліджень. Через те, що існують різноманітні методи виділення та очищення нуклеїнових кислот, вибір найбільш прийнятної методики базується на таких передумовах: цільова нуклеїнова кислота (РНК або ДНК); джерело нуклеїнових кислот і первинний матеріал (рослинні та тваринні тканини, мікроорганізми, листя, насіння, продукти переробки, фізіологічні рідини тощо); очікувані результати (вихід, чистота, час, потрібний ступінь очищення та ін.); мета подальшого використання нуклеїнових кислот (ПЛР, клонування, введення мітки, блот-гібридизація, ПЛР у реальному часі, синтез кДНК тощо).

Найчастіше отримання препаратів нуклеїнових кислот поділяють на низку етапів виділення: підготовка матеріалу до виділення; лізис клітин; ферментативне руйнування білків та/або депротеїнізація клітинного лізату за допомогою фе-

нолу і хлороформу; очистка від низько- та високомолекулярних домішок; осадження.

Основним етапом виділення нуклеїнових кислот із первинного матеріалу є лізис клітин, з подальшою інактивацією клітинних нуклеаз та відділенням цільової нуклеїнової кислоти від клітинної маси. Насамперед потрібно відокремити ДНК від білків, що входять до складу нуклеопротейдних комплексів хроматину. Часто ідеальна методика лізису є поєднанням декількох процедур; причому вона має бути досить жорсткою, щоб дезінтегрувати структури міцного вихідного матеріалу (наприклад, рослинних тканин), і водночас досить делікатною, щоб залишити в нативному вигляді цільові нуклеїнові кислоти, оскільки довгі лінійні молекули ДНК під час їх виділення з клітини фрагментуються. Зазвичай процедура лізису включає механічне руйнування (наприклад, подрібнення, осмотичний шок), хімічну обробку (наприклад, за допомогою детергентів (додецилсульфат натрію, ЦТАБ) та хаотропних агентів (наприклад, гуанідін ізотіоціанат)) та ферментативний протеоліз білків (наприклад, за допомогою протеїнази К).

Методики очищення нуклеїнових кислот зазвичай є комбінацією не менш ніж двох таких методів: виділення / осадження, хроматографія, центрифугування або афінне розділення.

1. Отримання ДНК з використанням бромистого цетилтриметиламонію

Принцип методу. У методі з використанням бромистого цетилтриметиламонію (ЦТАБ) лізис мембран здійснюється детергентом (ЦТАБ), що міститься в буфері для екстракції. Через те, що хімічний склад ліпідів і детергенту подібний, компоненти ЦТАБ у буфері для екстракції можуть здійснювати «захоплення» ліпідів, що утворюють мембрани клітин і ядер. За певної концентрації солі (NaCl) детергент утворює нерозчинний комплекс із нуклеїновими кислотами. ЕДТА є хелатним агентом, який, поряд з іншими металами, здатний зв'язувати магній. Магній є кофактором ДНКаз. У разі зв'язування магнію з ЕДТА знижується активність наявних ДНКаз. Буфер Tris-HCl надає розчину здатності підтримувати рН (через те, що і низькі, і високі значення рН спричиняють ушкодження ДНК). Отримання препарату ДНК включає два етапи – виділення та осадження.

Під час виділення необхідно відділити з водного розчину, в якому знаходиться ЦТАБ-комплекс нуклеїнових кислот, полісахариди, білки, фенольні сполуки та інші складники клітинного лізату. За високої концентрації солі ДНК утворює зі ЦТАБ стабільні та розчинні комплекси. Домішки з комплексу нуклеїнових кислот не осідають і можуть бути видалені з водного розчину екстракцією хлороформом, який денатурує білки і полегшує розділення водної та органічної фаз. Якщо необхідно, для того, щоб повністю видалити домішки з водного шару, екстракцію хлороформом повторюють два або три рази. Щоб досягти кращого виходу нуклеїнових кислот, органічну фазу доцільно повторно екстрагувати водним розчином, а далі додати його до першого екстракту.

Осадження проводять за умови зниження концентрації солі ($<0,4$ М NaCl) комплекси ДНК-ЦТАБ випадають в осад, тоді як більша частина полісахаридів залишається в розчині. Після цього осад розчиняють у розчині NaCl (>1 М) та осаджують спиртом (етиловий або ізопропіловий). Обробка 70 % етанолом дає змогу провести додаткове очищення та відмивання нуклеїнових кислот від залишку солі. Кількісна і якісна оцінка зразка отриманої ДНК здійснюється за стандартною процедурою електрофорезу ДНК в агарозному гелі шляхом візуального порівняння зі зразками відомої концентрації. Спектрофотометричне визначення дає більш точну характеристику препарату ДНК.

Перебіг аналізу. Для підготовки сухого рослинного матеріалу (зерно) наважку переносять у стерильні ступки. Розтирають зернівки, максимально зберігаючи матеріал в одному місці ступки. Обережно переносять матеріал зі ступки у пробірку Eppendorf об'ємом 1,7 мл. Для підготовки зеленої маси чистим пінцетом переносять шматочок зеленої маси (розміром $\approx 0,5 \times 0,5$ см) у стерильну ступку. Виділення ДНК проводять, додаючи 600 мкл лізуючого буфера: для зеленої маси матеріал переносять у ступку, та гомогенізують, з подальшим перенесенням у чисту стерильну пробірку; для сухого матеріалу у пробірку, у якій осад матеріалу збивається на вортексі.



Рис. 38. Вортекс

Перемішують суміш у пробірках на термошейкері за 65°C протягом 15 хв. Додають 500 мкл суміші хлороформ–ізоаміловий спирт (24 : 1). Змішують на вортексі до утворення емульсії. Центрифугують за 12 000 об./хв 5 хв. Відбирають 200 мкл верхньої водної фази, що містить ДНК, та переносять її у чисту пробірку Eppendorf 1,7 мл. Додають 140 мкл ізопропанолу, залишають на 5 хв за кімнатної температури.

Центрифугують за 12 000 об./хв протягом 20 хв. Зливають супернатант і додають 0,8 мл 70 % етанолу. Ресуспендують піпеткою або на вортексі за 12 000 об./хв. Обережно зливають супернатант. Залишок у пробірці центрифугують 2 хв і залишки етанолу відбирають піпеткою. Висушують осад за температури 55°C і розчиняють ДНК у 75 мкл TE буфера, pH 8,0. Пробірки з виділеним препаратом ДНК заморожують.

2. Отримання препаратів ДНК за допомогою твердофазних методів виділення

Принцип методу. У твердофазних методах виділення ДНК використовують такі процеси та принципи: водневі зв'язки з немодифікованою гідрофільною матрицею, зазвичай кварцем, у хаотропних умовах; іонообмін у водному розчині, зазвичай з використанням аніонообмінників; механізми виключення за розмірами. Для виділення нуклеїнових кислот у твердофазних системах застосовують

хроматографічні сепараційні колонки, носіями в яких є частинки на основі кварцу або скляних волокон, частинки з аніонообмінними властивостями, які адсорбують нуклеїнові кислоти. Ці носії застосовуються для виділення або очищення нуклеїнових кислот із висококонцентрованими розчинами хаотропних солей (йодид натрію, перхлорат натрію, гуанідин тіоціанату). Твердофазні методи виділення поділяють на виділення на склі або твердих частинках та методи на основі магнітного сепарування.

Методи виділення нуклеїнових кислот на склі або твердих частинках включає в себе стадію лізису клітин сильним хаотропним агентом, який руйнує клітинні мембрани і інактивує внутрішньоклітинні нуклеази, і подальшу сорбцію нуклеїнової кислоти на носії. Нуклеїнова кислота оборотно зв'язується зі склом у присутності високої концентрації хаотропних солей (наприклад, гуанідин хлориду, гуанідин тіоціанату). У таких умовах зв'язування білків із матрицею не відбувається. Хаотропні сполуки – це речовини, що порушують впорядковану структуру води, чим призводять мембрани до стану хаосу (наприклад, сечовина, йодид натрію). Отже, крім зв'язування, хаотропні агенти забезпечують руйнування клітинних мембран і лізис клітин із подальшим вивільненням нуклеїнової кислоти. Домішки відмиваються хаотропною сіллю, а хаотропна сіль – 80 % етанолом. Очищена нуклеїнова кислота знімається зі скла буфером із низькою іонною силою.

Перебіг аналізу. Підготовка сухого рослинного матеріалу проводиться у певний спосіб. Отриманий сухий матеріал (зерно) переноситься у стерильні ступки. Зернівку розтирають, максимально зберігаючи матеріал в одному місці ступки. Обережно перенести матеріал зі ступки у пробірку Eppendorf об'ємом 1,7 мл. Для отримання препарату ДНК з зеленої маси чистим пінцетом переносять шматочки зеленої маси (розміром $\approx 0,5 \times 0,5$ см) у стерильну ступку. У ступці відбирають зразок масою приблизно 100–200 мг, додають стерильний пісок. Далі до рослинного матеріалу додають 300 мкл лізуючого буфера (для зеленої маси – у ступці, і гомогенізують з подальшим перенесенням у чисту стерильну пробірку; сухий матеріал переносять у пробірку та збивають осад на вортексі). Перемішують суміш у пробірках на термошейкері за 65 °C протягом 15 хв. Додають 300 мкл суміші хлороформ–ізоаміловий спирт (24 : 1). Змішують на вортексі до утворення емульсії. Центрифугують за 12 000 об./хв протягом 5 хв. Відбирають 100 мкл верхньої водної фази, що містить ДНК, та переносять її у чисту пробірку Eppendorf 1,7 мл. Додають 300 мкл Binding Buffer та 5 мкл суспензії Silica. Змішують на вортексі до отримання однорідної суспензії. Суміш центрифугують протягом 10 с за 12 000 об./хв. Додають 500 мкл буфера для промивки і змішують на вортексі до отримання однорідної суспензії. Знову центрифугують протягом 5 с за 12 000 об./хв. Обережно зливають надосадову рідину. Далі повто-

рити операції змішування та центрифугування ще два рази. Механічною піпеткою відбирають залишки спирту. Центрифугальні пробірки у відкритому стані ставлять на шейкер для підсушування за 55 °С. Після підсушування додають 50 мкл ТЕ буфера (рН 8.0). Змішують на вортексі до отримання однорідної суспензії. Перемішують суміш у пробірках на термошейкері за 55 °С протягом 5 хв. Далі суміш центрифугують протягом 20 с за 12 000 об./хв, відбирають 30 мкл надосадової рідини в окрему підписану пробірку і залишають за температури 20 °С для подальшого електрофоретичного розділення.

Обладнання

1) мікроцентрифуга на 12 000 об./хв; 2) витяжна шафа; 3) термошейкер; 4) вортекс; 5) стерильні ступки з товкачиками; 6) штативи для пробірок; 7) автоматичні дозатори з наконечниками на 1 000 мкл та 200 мкл; 8) мікропробірки Ерпендорф на 1,7 мл; 9) рукавички.



Рис. 39. Лабораторний шейкер для пробірок PS-1

Реактиви

1) лізуючий буфер (готовий реактив); 2) деіонізована вода; 3) суміш хлороформ–ізоаміловий спирт 24 : 1; 4) ізопропанол; 5) етанол 70 % розчин; 6) Binding Buffer (готовий реактив); 7) промивний буфер; 8) ТЕ-буфер; 9) суспензія Silica (готовий реактив).

Приготування реактивів

Реактив № 8 (буфер ТЕ (широко застосовний буферний розчин у біохімії та молекулярній біології, використовується для виділення ДНК, кДНК і РНК)). Для приготування готують 10 мМ трис, рН якого доводять до 8,0 розчином соляної кислоти та 1 мМ ЕДТА. Для приготування 100 мл буфера ТЕ використовують деіонізовану воду, 1 мл 1 М Tris-HCl рН 8,0 та 200 мкл 0,5 М ЕДТА.

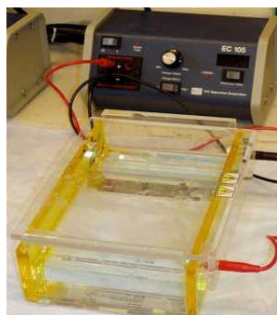
ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАНЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Із якою метою проводять виділення та аналіз нуклеїнових кислот?
2. Основні методи виділення ДНК з біологічного матеріалу.
3. Основні принципи та підходи для збереження та підготовки проб зразків рослинного, тваринного та бактеріального походження у молекулярно-генетичному аналізі.
4. Основні етапи виділення загальної ДНК з рослинного, тваринного бактеріального матеріалу.
5. Основні компоненти розчинів для виділення ДНК.
6. Зберігання препаратів загальної ДНК. Функції у зберіганні ДНК буфера 10 мМ Tris-1 мМ ЕДТА, з рН 8,0 (ТЕ буфер).

7. ЦТАБ метод виділення загальної ДНК.
8. Хаотропні агенти в молекулярних дослідженнях, принципи їх дії.
9. Основні твердофазні методи виділення загальної ДНК.
10. Принципи основних етапів виділення ДНК методом Silica.
11. У чому полягає модифікація методу із застосуванням магнітних частинок?
12. Переваги і недоліки твердофазних методів виділення ДНК.
13. Як відрізняється підготовка проб для сухого рослинного матеріалу і для зеленої маси?

РОБОТА 11.5. АГАРОЗНИЙ ГЕЛЬ-ЕЛЕКТРОФОРЕЗ ФРАГМЕНТІВ ДНК

Принцип методу. Горизонтальний агарозний гель-електрофорез – метод, який використовується в молекулярній біотехнології, для розділення фрагментів ДНК та РНК різної довжини. Молекули нуклеїнових кислот розділяють, застосовуючи електричне поле, внаслідок чого негативно заряджені частинки рухаються в агарозному гелі. Молекули меншої довжини переміщуються швидше та мігрують у гелі далі, порівняно з довгими фрагментами. Гель-електрофорез виконується у спеціальних камерах (рис. 40) і використовується як антиконвективне середовище, тобто середовище, в якому відбувається «просіювання» заряджених частинок під дією електричного поля.



*Рис. 40. Камера
для горизонтального
гель-електрофорезу*

Гелі пригнічують теплову конвекцію, викликану електричним полем, та виконують функцію середовища просіювання (сита). Гель-електрофорез ДНК зазвичай виконується з аналітичною метою, часто після збільшення кількості специфічних фрагментів ДНК завдяки полімеразній ланцюговій реакції (ПЛР), а також як підготовчий етап для встановлення якості виділення ДНК.

Агароза складається з довгих послідовностей лінійних полісахаридів, утворених чергуванням залишків Р-О-галактопіранози та 3,6-ангідридо- α -1-галактопіранози, з'єднаних 1–4-глікозидними зв'язками. Різні зразки, внесені в суміжні лунки, будуть рухатися паралельно, але з різною швидкістю, залежно від молекулярної маси фрагментів ДНК. Залежно від кількості різних молекул у пробі, кожна лінія демонструватиме окремий компонент вихідної суміші. Лінії в гелі, які знаходяться на однаковій відстані від початку гелевого блоку, містять молекули, які рухаються з однаковою швидкістю, що зазвичай свідчить, що вони майже однакового розміру. Для того, щоб установити довжини фрагментів, використовують маркери відомого розміру. Існує велика кількість маркерів дов-

жини ДНК, зокрема такі: лямбда HindIII, лямбда PstI, PhiX174. Маркери підбирають залежно від того, якої довжини фрагменти ДНК розраховують отримати. Для продуктів ПЛР невеликого розміру обирають PhiX174, а для фрагментів 6 тис. пар основ – лямбда HindIII. Зараз компанії виробники пропонують маркери з групами «бендів» у певних інтервалах: 0,5; 1,0; 1,5; 2; 2,5 тис. пар основ і так далі до 10 тис. пар основ. Агарозний гелі-електрофорез може використовуватися для розподілу фрагментів ДНК в межах від 50 пар основ до декількох мільйонів. Під час використання гелів із різними концентраціями агарози можна розділити фрагменти ДНК різних довжин. Вищі концентрації агарози дають можливість провести розподіл менших фрагментів ДНК, тоді як низькі концентрації агарози дають змогу розподілити в гелі великі фрагменти ДНК. На рис. 41 показано переміщення ряду фрагментів ДНК в агарозному гелі трьох різних концентрацій, які розподіляються в одній і тій самій камері, за умови використання однакової напруги та протягом однакового проміжку часу.

Потрібно звернути увагу, що великі фрагменти набагато краще розподілені в 0,7 % гелі, тоді як маленькі фрагменти відокремилися краще в 1,5 %.

Оскільки напруга, прикладена до гелю, збільшується, то великі фрагменти мігрують пропорційно швидше, порівняно з маленькими. Найкращий розподіл фрагментів ДНК довжиною 2 тис. пар основ досягається під час застосування напруги не більше ніж 5 В на см² гелю.

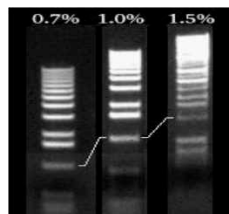


Рис. 41. Розподіл фрагментів ДНК

На сьогоднішній день рекомендовано декілька різних буферів для електрофорезу фрагментів ДНК. Зазвичай для подвійної ДНК використовують ТАЕ (трис-ацетат-ЕДТА) та ТВЕ (трис-борат-ЕДТА). Фрагменти ДНК мігрують у гелі за різних умов у цих двох буферних системах, оскільки розчини мають різну іонну силу. Буфери не лише визначають рН-показник, але і забезпечують іони для підтримки електропровідності.

Під час електрофорезу проводять фарбування макромолекул, щоб зробити їх видимими. ДНК можна візуалізувати, використовуючи бромистий етидій, який позначається як EtBr. Фрагменти ДНК, які рухаються через EtBr-гель, накопичують цей барвник, що і дає можливість візуалізації цих молекул під ультрафіолетовим світлом. Інтенсивність флюорисценції залежить від кількості ДНК, тому для візуалізації необхідно не менше 20 нанограмів ДНК. EtBr – відомий мутаген, тому зараз за можливості використовуються менш небезпечні барвники, такі як SYBR Green I, який у 25 разів більш чутливий та безпечний, ніж EtBr.

Перебіг аналізу. Готують робочий розчин буфера трис-борат-ЕДТА 10 × ТВЕ, для чого 218 г трис, 110 г борної кислоти та 9,3 г ЕДТА розчиняють у 1,9 л дистильованої води. рН розчину доводять до 8,3 сухою борною кислотою або роз-

чином NaOH. Об'єм розчину доводять до 2 л дистильованою водою. Із робочого розчину готують 1 × ТБЕ в об'ємі, достатньому для заповнення камери для електрофорезу та приготування гелю.

Для приготування гелю додають до 1 × ТБЕ агарозу в кількості, необхідній для отримання 0,45–0,75 % розчину та нагрівають на водяній бані до повного розчинення агарози. Охолоджують суміш приблизно до 50 °С. За час охолодження заклеюють краї кювети для гелю клейкою стрічкою (рис. 42). Додають до розчину агарози бромистий етидій до кінцевої концентрації 0,5 мкг/мл та обережно перемішують, уникаючи виникнення в гелі пухирців повітря. Теплу агарозу вливають у кювету для гелю і рівномірно розподіляють її у кюветі. Вертикально вставляють гребінку так, щоб її зубчики не доторкалися до дна кювети приблизно на 1,5 мм. Залишають кювету з агарозним гелем на 30 хв, далі обережно видаляють гребінку та клейку стрічку. Кювету з гелем приміщують у камеру для електрофорезу, яка містить необхідну кількість 1 × ТБЕ з бромистим етидієм у кінцевій концентрації 0,5 мкг/мл.

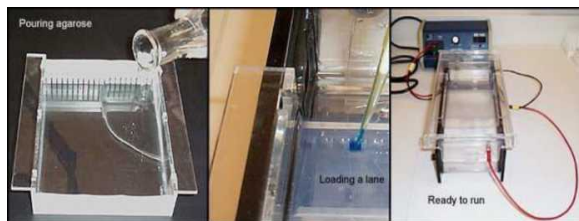


Рис. 42. Приготування гелю та внесення проб у лунки

Далі готують до електрофорезу зразки досліджуваної ДНК, змішуючи препарати ДНК з буфером для нанесення (5 : 1). Щоб отримати чіткий сигнал після забарвлення бромистим етидієм, у лунку шириною 5 мм достатньо внести 200 нг

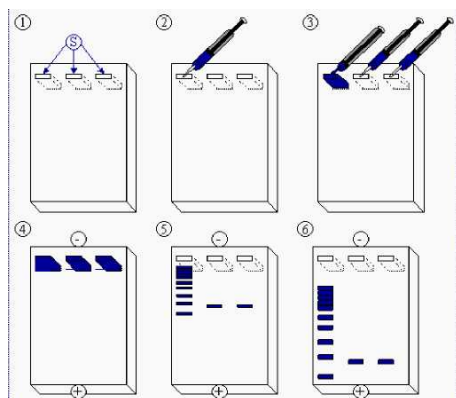


Рис. 43. Внесення проб ДНК у лунки

маркерної ДНК. Для побудови стандартної кривої необхідно використовувати маркерні фрагменти, довжина яких приблизно рівна довжині досліджуваної ДНК.

Обережно вносять в лунку досліджувану та маркерну ДНК (рис. 43). Для підвищення точності визначення розміру фрагменту ДНК маркерну ДНК вносять з обох боків від досліджуваної.

Підключають електроди горизонтальної камери для електрофоре-

зу до джерела живлення та виконують електрофоретичне розділення фрагментів ДНК за умови градієнта напруженості 1–3 В на 1 см гелю протягом 1–3 год.

У разі, якщо необхідно перевірити, чи вдалося виділити ДНК з біологічного матеріалу, у гель з етидіумом-бромідом вносять 20 нг проби ДНК. Для візуалізації продуктів полімеразно-ланцюгової реакції зазвичай використовують 10–20 мкл залежно від умов реакції.

Аналіз одержаних результатів

Для аналізу результатів необхідно виийняти шпателем агарозний гель, перенести його на транслюмінатор і в ультрафіолетовому світлі проаналізувати результати розділення фрагментів ДНК. Зафіксувати результати за допомогою фото-системи та вклеїти зображення в робочий зошит.



Рис. 44. Транслюмінатор

Обладнання

1) камера для горизонтального гель-електрофору та блок живлення; 2) кювета для заливки гелю; 3) типові гребінки для створення лунок; 4) транслюмінатор (ультрафіолетовий лайтбокс); 5) латексні рукавички.

Реактиви

1) буфер трис-борат-ЕДТА (ТБЕ) (0,9 М трис, 0,9 М борна кислота, 20 мМ ЕДТА. рН доводять до 8,1–8,2 сухою борною кислотою); 2) агароза; 3) бромистий етидій (10 мг/мл у стерильній дистильованій воді); 4) бромфеноловий синій.

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАТЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Які фізико-хімічні властивості ДНК?
2. Який фізичний принцип електрофоретичного методу дослідження біомолекул?
3. Від яких фізико-хімічних чинників залежить ефективність електрофоретичного розділення нуклеїнових кислот?
4. Які барвники і чому використовують для візуалізування результатів електрофорузу нуклеїнових кислот?

12. АНАЛІЗ РЕЧОВИН ВТОРИННОГО ПОХОДЖЕННЯ

РОБОТА 12.1. ВИЗНАЧЕННЯ ЗАГАЛЬНОЇ КИСЛОТНОСТІ

Загальна кислотність може бути визначена алькаліметричним або ацидиметричним титруванням із використанням відповідних індикаторів або потенціометричним методом.

Принцип методу. Органічні кислоти витягаються з подрібненого рослинного матеріалу за допомогою нагрівання у воді за температури 80–90 °С протягом 30 хв. Загальна кількість кислот зазвичай перераховується в яблучну кислоту, оскільки вона переважає у багатьох рослинних тканинах.

Перебіг аналізу. Свіжий рослинний матеріал акуратно подрібнюють на терці, у м'ясорубці або ступці, ретельно перемішують, беруть наважку 20 г і переносять у колбу об'ємом 250 мл. У колбу додають 150 мл дистильованої води та витримують протягом 30 хв за температури 80–90 °С на водяній бані. Далі колбу охолоджують водопровідною водою, доводять об'єм рідини до 200 мл і фільтрують у суху склянку або колбу. Отриманий фільтрат слугує для визначення загальної кислотності. 50 мл фільтрату, що містить органічні кислоти, переносять у конічні колби об'ємом 100 мл, додають декілька крапель спиртового розчину фенолфталеїну і титрують із мікробюретки 0,1 N розчином гідроксиду натрію (NaOH) до блідо-рожевого забарвлення рідини. Замість фенолфталеїну як індикатор можна використовувати спиртовий розчин тимолфталеїну. У такому разі титрувати до появи синього забарвлення рідини.

У слабо забарвлених розчинах колірний перехід легко виявити, якщо порівняти колір із сусідньою колбою з такою самою кількістю екстракту з рослин із додаванням такої самої кількості крапель фенолфталеїну або тимолфталеїну. У тих випадках, коли розчин у колбі інтенсивно забарвлений (багато забарвлених речовин у витяжці, наприклад, антоціани) і перехід забарвлення рідин важко виявити, під час титрування використовують лакмусовий папір. Краплі рідини з колби під час титрування переносять на шматочок лакмусового паперу і спостерігають зміну кольору.

Під час розрахунку необхідно враховувати кількість розчину лугу, яка використана на титрування, та внести поправку на його титр:

$$X = \frac{a \times T \times 200 \times 10}{n \times 50},$$

де:

X – кількість кислот у рослинній пробі, мекв;

a – кількість 0,1 N NaOH, витрачена на титрування, мл;

T – корекція до титру розчину лугу;

200 – загальний об'єм витяжки, мл;

50 – об'єм витяжки, взятої для титрування, мл;

n – наважка рослинного матеріалу, г;

10 – перерахунок у міліеквіваленти кислот (1 мл 0,1 N. NaOH відповідає 0,1 мекв кислоти).

Часто вміст кислоти виражається не в міліеквівалентах на 1 г, а у відсотках. Для цього кількість міліеквівалентів множиться на масу 1 мекв кислоти у грамах: 1 мекв яблучної кислоти дорівнює 67 мг (0,067 г), лимонної – 64 мг, винної – 65 мг, щавлевої кислоти – 45 мг. Зазвичай для визначення переважання тієї чи іншої органічної кислоти в досліджуваному об'єкті для перерахунку використовується відповідний коефіцієнт.

Обладнання

1) водяна баня; 2) мірчі колби з пробкою об'ємом 200 мл; 3) конічні колби ємністю 100–200 мл; 4) лійки; піпетки; 5) мікробюретки; 6) фільтри.

Реактиви

1) гідроксид натрію (NaOH) 0,1 N розчин.

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАТЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Дайте характеристику речовин вторинного походження. На які класи вони поділяються?

2. Які речовини відносять до групи органічних кислот? Яку роль у життєдіяльності рослин вони відіграють?

3. Як класифікуються органічні кислоти? Які особливості будови молекул покладені в основу цієї класифікації?

4. На чому ґрунтується наведений метод визначення органічних кислот у рослинному матеріалі?

5. Дайте характеристику порядку виконання аналізу. Як обчислюється вміст органічних кислот у рослині?

РОБОТА 12.2. ВИЗНАЧЕННЯ КІЛЬКОСТІ ОРГАНІЧНИХ КИСЛОТ (ЗА Х. Н. ПОЧИНКОМ)

Принцип методу. Кислоти, що містяться в рослинах у вільному стані або у вигляді розчинних і нерозчинних у воді солей, вилучають азотною кислотою в 70 % етанолі. За цих умов клітинні пектини та інші колоїди залишаються в осаді. У отриманому розчині азотну кислоту нейтралізують гідроксидом натрію і органічні кислоти осаджують ацетатом свинцю. Осадження відбуваються в 70 % етанолу, підкисленого оцтовою кислотою, щоб запобігти утворенню основних солей. У 70 % етанолі свинцеві солі органічних кислот практично нерозчинні. Після відокремлення осаду його відокремлюють центрифугуванням та промиван-

ням 70 % етанолом. Для видалення надлишку свинцю осад обробляють карбонатом натрію. Внаслідок цього утворюється нерозчинний у воді карбонат свинцю, а органічні кислоти та пігменти у вигляді натрієвих солей переходять у розчин.

Перебіг аналізу. Зважують таку кількість рослинного матеріалу, щоб у ньому містилося від 5 до 30 мг сумарного вмісту органічних кислот (1–2 г свіжого або 0,3–0,5 г сухого рослинного матеріалу), і наважку розтирають у ступці спочатку з 0,5 г силікагелю або піску, а далі з 1 мл 2 N розчину азотної кислоти і 5 мл 70 % етанолу. Під час роботи з м'якими тканинами, які легко розтираються, силікагель додавати не потрібно. Розтерту масу переносять у центрифугальну пробірку, змиваючи залишки 10 мл 70 % етанолу. Ретельно перемішують скляною паличкою та настоюють протягом 15–20 хв за умови частого перемішування. Далі центрифугують і надосадовий розчин зливають у склянку на 50 мл, а до осаду додають 5 мл 70 % етанолу і настоюють 5 хв за умови частого розмішування. Після цього центрифугують, розчин зливають у склянку, а осад промивають ще один раз 5 мл 95 % етанолу, додають центрифугат до розчину у склянці. Для нейтралізації азотної кислоти додають одну краплю розчину фенолфталеїну і під час помішування 2 N розчин гідроксиду натрію до появи забарвлення індикатору. У разі, коли досліджуваний розчин забарвлений, для нейтралізації азотної кислоти додають 1 мл 2 N розчину гідроксиду натрію. Після нейтралізації азотної кислоти додають 0,3 мл концентрованої оцтової кислоти та 1 мл 20 % розчину ацетату свинцю, розмішують та залишають на 30 хв для випадіння осаду. Далі суміш центрифугують, надосадову рідину зливають у склянку з відпрацьованим етанолом, а склянку і осад, що знаходиться у центрифугальній пробірці, промивають 2 рази 70 % етанолом порціями по 5 мл. У такий спосіб весь осад переносять у пробірку.

До промитого осаду додають 10 мл 1 % розчину карбонату натрію і перемішують скляною паличкою протягом 5 хв, поки весь осад не розкладеться і свинець не перетвориться на карбонат, який відокремлюється центрифугуванням. Прозорий розчин відкидають, а до осаду доливають 10 мл 0,1 N розчину соляної кислоти, розмішують та виливають у колбу для титрування об'ємом 100 мл, змиваючи залишок дистильованою водою. У отриманому осаді свинець визначають комплексометричним методом. Для цього додають 3 мл аміачного буферного розчину, 5 мл розчину трилону В, 50 мг індикатору хромогену чорного ЕТ-00 і титрують 0,02 N розчином сульфату магнію до переходу синьо-зеленого забарвлення у вино-червоний. Окремо титрують 5 мл 0,1 N розчину трилону В 0,02 N розчином сульфату магнію. За отриманими даними сума кислот розраховується за формулою:

$$X = \frac{6,7 \times (a - b) \times K}{n},$$

де:

X – вміст суми кислот (у %) у перерахунку на яблучну кислоту;

a – об'єм 0,02 N розчину сульфату магнію, витрачений на титрування 5 мл 0,1 N розчину трилону В, мл;

b – об'єм 0,02 N розчину сульфату магнію, витраченого для визначення кислот, мл;

K – нормальність розчину сульфату магнію;

n – наважка рослинного матеріалу, г;

6,7 – нормальний титр яблучної кислоти, помножений на 100 для перетворення в проценти.

Обладнання

1) фарфорові ступки з товчачиками; 2) скляні склянки об'ємом 50 мл; 3) конічні колби об'ємом 100 мл; 4) мірчі піпетки; 5) бюретки для титрування; 6) аналітичні терези.

Реактиви

1) нітратна кислота (HNO_3) 2 N розчин; 2) етанол ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) 70 % розчин; 3) оцтова кислота (CH_3COOH) концентрована; 4) гідроксид натрію (NaOH) 2 N розчин; 5) ацетат свинцю ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$) 20 % розчин; 6) карбонат натрію (Na_2CO_3) 1 % розчин; 7) соляна кислота (HCl) 0,1 N розчин; 8) трилон В; 9) хромоген чорний ET-00; 10) фенолфталеїн 0,1 % спиртовий розчин; 11) сульфат магнію (MgSO_4) 0,002 N розчин.

Приготування реактивів

Реактив № 1 (2 N розчин азотної кислоти). 127 мл азотної кислоти густиною 1,42 розводять дистильованою водою до 1 л та перемішують.

Реактив № 2 (70 % розчин етанол). До 100 мл 95 % етанолу додають 39 мл дистильованої води і перемішують.

Реактив № 5 (20 % розчин ацетату свинцю). Зважують 20 г ацетату свинцю ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) розчиняють у 80 мл дистильованої води, додають 1 мл концентрованої оцтової кислоти і доводять об'єм розчину дистильованою водою до 100 мл.

Реактив № 7 (0,1 N розчин соляної кислоти). Готують із 1 N розчину шляхом розведення у 10 разів дистильованою водою.

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Охарактеризуйте принцип методу визначення органічних кислот за Х. Н. Починком.

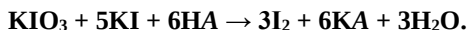
2. Як проводиться осадження солей органічних кислот? У який спосіб проводиться очистка осаду?

3. Наведіть методику визначення свинцю. Для чого проводиться це визначення?

4. Як обчислюється вміст органічних кислот у рослинному матеріалі?

РОБОТА 12.3. ВИЗНАЧЕННЯ ВІЛЬНИХ ОРГАНІЧНИХ КИСЛОТ (ЗА Х. Н. ПОЧИНКОМ)

Вільні органічні кислоти можна визначити йодометричним методом за допомогою реакції:



де A^- – кислотний аніон.

До аналізованого розчину, що містить вільні кислоти, у надлишку додають нейтральний розчин йодиду та йодату калію. Вивільнений йод титрують розчином тіосульфату натрію. Ця реакція у розчинах із високою концентрацією іонів водню відбувається миттєво, але сповільнюється зі зниженням концентрації іонів водню, тому слабкі кислоти не можуть бути безпосередньо визначені, оскільки концентрація іонів водню у кінці титрування недостатня для протікання реакції.

Аніони органічних кислот утворюють комплексні сполуки з калієм, барієм, магнієм і цинком і за наявності цих катіонів поведуться як сильні кислоти. Винну, лимонну, молочну та яблучну кислоти можна визначити кількісно, якщо до розчину цих кислот додати надлишок хлориду барію або хлориду кальцію, а далі йодид та йодат калію. Через 30 хв реакція закінчується і йод, який виділився внаслідок реакції, можна відтитрувати тіосульфатом. Цей метод не застосовується для визначення органічних кислот, як-от оцтова, бензойна і бурштинова, оскільки ці кислоти не містять гідроксильних груп і не утворюють міцних комплексних сполук з іонами лужноземельних металів.

Якщо до розчину кислоти додати титрований розчин тіосульфату натрію, що містить йодат і йодид калію в надлишку і через деякий час титрувати надлишок тіосульфату натрію розчином йоду, то можна визначити не тільки винну, лимонну, щавлеву і яблучну, а також бурштинову і бензойну кислоти.

Перебіг аналізу. Визначення вмісту вільних органічних кислот різняться залежно від очікуваного вмісту та якісного складу органічних кислот.

1. Визначення вільних кислот у об'єктах, що не містять бурштинової кислоти. Зважують 5 г свіжого рослинного матеріалу і подрібнюють у фарфоровій ступці з 5 мл 10 % розчину хлориду барію. Розтерту масу переносять в центрифугальну пробірку, залишок змивають дистильованою водою, перемішують і центрифугують. Центрифугат заливають у мірчу колбу об'ємом 50 мл. До залишку в пробірці додають 1 мл розчину хлориду барію, 10 мл дистильованої води, перемішують та знову центрифугують. Центрифугат додається до першої порції, а осад промивають водою один раз, додаючи промивну воду до основно-

го розчину. Об'єм доводять водою до 50 мл і перемішують. Залежно від можливої кількості кислот у витяжці піпеткою відбирають 10 мл або більшу кількість розчину (об'єм фіксують) і переносять у колбу для титрування, додають 5 мл 10 % розчину хлориду барію і 5 мл 0,1 N розчину йодиду-йодату калію, перемішують, закривають колбу пробкою і залишають на 30 хв. Після цього додають 0,5 мл розчину крохмалю і титрують 0,01 N розчином тіосульфату натрію до зникнення блакитного забарвлення рідини. Вміст вільних кислот у перерахунку на яблучну кислоту розраховують за формулою:

$$X = \frac{6,7 \times 50 \times K \times a}{n \times b} = \frac{335 \times K \times a}{n \times b},$$

де:

X – вміст вільних кислот у перерахунку на яблучну кислоту, %;

50 – загальний об'єм витяжки, мл;

b – об'єм досліджуваного розчину, взятого для титрування, мл;

a – об'єм розчину тіосульфату натрію, витрачений на титрування, мл;

K – нормальність розчину тіосульфату;

n – маса досліджуваної речовини, г;

6,7 – нормальний титр яблучної кислоти, помножений на 100 для перетворення на відсотки.

2. Визначення вільних органічних кислот у присутності бурштинової кислоти. Отримання екстракту з рослинного матеріалу здійснюється так само, як і під час визначення вільних кислот в об'єктах, які не містять бурштинової кислоти. Необхідну кількість отриманого розчину, яка містить від 2 до 20 мг вільних кислот у перерахунку на яблучну кислоту, переносять у колбу для титрування, додають 5 мл 10 % розчину хлориду барію, 5 мл 0,1 N розчину йодид-йодату, 5 мл 0,1 N розчин тіосульфату натрію і залишають на 20 хв. Після цього додають 0,5 мл розчину крохмалю і титрують 0,02 N розчином йоду до появи синього забарвлення. Вміст кислоти розраховують за формулою:

$$X = \frac{6,7 \times 50 \times (0,5 - K \times a)}{n \times b} = \frac{335 \times (0,5 - K \times a)}{n \times b},$$

де:

X – вміст вільних кислот у перерахунку на яблучну кислоту, %;

0,5 – об'єм 1 N розчину тіосульфату натрію, доданого в досліджуваний розчин, мл;

a – об'єм розчину йоду, витраченого на титрування надлишку тіосульфату натрію, мл;

K – нормальність розчину йоду.

Решта позначень такі самі, як і під час розрахунку вмісту вільних кислот у зразках, які не містять бурштинової кислоти.

Обладнання

1) аналітичні терези; 2) фарфорові ступки з товкачками; 3) центрифуга; 4) центрифугальні пробірки; 5) мірчі колби об'ємом 50 мл; 6) конічні колби для титрування.

Реактиви

1) хлорид барію (BaCl_2) 10 % розчин; 2) йодид-йодат калію ($\text{KI} + \text{KIO}_3$) 0,1 N розчин; 3) крохмаль 0,5 % розчин; 4) тіосульфат натрію ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 0,1 та 0,01 N розчини; 5) йод (I_2) 0,02 N розчин.

Приготування реактивів

Реактив № 2 (0,1 N розчин йодиду-йодату калію). Зважують 3,567 г йодату калію (KIO_3) та 40 г йодиду калію KI , розчиняють у дистильованій воді. Розчин переносять у мірчу колбу об'ємом 1 л, змиваючи посудину для розчинення солей дистильованою водою. Доводять об'єм розчину дистильованою водою до 1 л, розмішують і зберігають у темній пляшці.

Реактив № 5 (0,02 N розчин йоду для титрування). Готують із 0,1 N розчину йоду шляхом розведення 5 разів дистильованою водою. Для приготування 0,1 N розчину у скляному бюксі зважують 12,691 г йоду (I_2) та переносять у мірчу колбу ємністю 1 л, додають 26 г йодиду калію (KI) 35 мл дистильованої води і струшують до повного розчинення йоду. Після цього доводять об'єм розчину водою до мітки і перемішують. Для приготування 0,02 N розчину відбирають піпеткою 50 мл 0,1 N розчину, примішують у мірчу колбу ємністю 250 мл, доводять дистильованою водою до мітки та перемішують.

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Які речовини рослин належать до вільних органічних кислот? У чому полягають їх особливості?
2. Наведіть приклади фізіолого-біохімічних процесів рослинних клітин, у яких беруть участь вільні органічні кислоти.
3. Охарактеризуйте принцип методу визначення вільних амінокислот за Х. Р. Починком.
4. Як здійснюється визначення кількості вільних органічних кислот у рослинному матеріалі, який не містить бурштинової кислоти?
5. Як здійснюється визначення кількості вільних органічних кислот у рослинному матеріалі, який містить бурштинову кислоту?

РОБОТА 12.4. ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ЛИМОННОЇ КИСЛОТИ

Методи визначення лимонної кислоти ґрунтовані на окисненні її до ацетону з наступним перетворенням у пентабромацетон.

Принцип методу. Лимонна кислота окислюється перманганатом калію (KMnO_4) у присутності броміду калію (KBr) до пентабромацетону. Далі бром витісняється з пентабромацетону сульфідом натрію (Na_2S), а отриманий бромід визначається йодометрично.

Перебіг аналізу. Цей метод дає змогу визначити 2,5–5,0 мг лимонної кислоти. Однак у процесі аналізу проводиться п'ятикратне розведення. Тому кількість аналітичного матеріалу визначається так, щоб у 10 мл розчину містилося 2,5–25 мг лимонної кислоти (з урахуванням усіх розведень). Наважку ретельно подрібненого рослинного матеріалу переносять у мірчу колбу з широким горлом, додають 150 мл води і екстрагують протягом 1 год на гарячій водяній бані. Під час аналізу сушеного матеріалу однієї екстракції буває недостатньо, тому проводять 3–4 екстракції з меншими об'ємами води протягом 30 хв і об'єднують екстракти. Об'єм екстракту в колбах доводять до мітки дистильованою водою. Зазвичай водний екстракт містить певну кількість білкових речовин, які неможливо видалити з розчину. Для осадження білків беруть 25 мл екстракту, переносять у мірчу колбу об'ємом 50 мл і додають 5 мл розчину метафосфорної кислоти. Замість метафосфорної кислоти можна додати 5–10 мл 5 % фосфорновольфрамкової кислоти. Розчин у колбі доводять водою до позначки. Для аналізу з колби беруть 10 мл розчину.

До 10 мл екстракту додають 2 мл 18 N сірчаної кислоти (H_2SO_4), 8 мл води і слабо кип'ятять протягом 5 хв. Після охолодження додають 1 мл насиченої бромної води і залишають на 5 хв. Далі суміш фільтрують через скляний фільтр-тигель Гуча № 4, який вставляють у конічну колбу з довгим горлом ємністю 100 мл, що має позначку 35 мл. Фільтрацію проводять зі слабким відкачуванням повітря. Фільтр промивається малими порціями води до досягнення кількості фільтрату приблизно 35 мл.

Колбу занурюють у водяну баню з температурою 20 °C (строго стежать за температурою), додають 2 мл 1 M розчину KBr і 5 мл 1,5 N розчину KMnO_4 і витримують колбу у бані протягом 10 хв. Далі колбу з екстрактом охолоджують до 8–10 °C, занурюючи її у льодяну воду, яку вносять у хімічну склянку об'ємом 1 л. У охолоджений розчин додають краплями під час постійного перемішування 3 % розчин H_2O_2 , поки розчин у колбі не знебарвиться. За цих умов лимонна кислота, присутня в розчині, перетворюється в пентабромацетон, який необхідно вилучити з розчину. Для екстракції пентабромацетону використовують чистий петролейний ефір із температурою кипіння 40–60 °C. Розчин із колби переносять у ділільну ліжку ємністю 100–125 мл і промивають невеликими порціями петролейного ефіру (сумарний об'єм ефіру 25 мл). Ефірну фракцію переносять у іншу ділільну ліжку та інтенсивно струшують і зливають водний шар. Далі петролейно-ефірний екстракт промивають у ділільній ліжці декілька разів во-

дою, яка не містить галогенів, відкидаючи промивну воду. Промитий водою екстракт струшують у ділильній лійці двома послідовними порціями (кожна по 3 мл) 4 % розчину сульфідру натрію ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$), зливаючи забарвлений розчин у мірчу колбу ємністю 25 мл. Петролейний ефір у ділильній лійці промивають 2–3 рази водою (по 2 мл кожного разу) до повного видалення бромру (промивна вода повинна бути прозорою). Промивні води зливають у мірчу колбу і додають 2 мл 2 М H_3PO_4 і кілька разів ретельно промивають водою з додаванням зерен кварцу або невеликих шматків розбитого скла. Вміст колби обережно кип'ятять протягом 3 хв, охолоджують і додають із мікробюретки точно 5 мл 0,0125 М розчину хлориду калію (KCl). Після додавання KCl об'єм розчину в колбі доводять водою до мітки.

Подальший перебіг аналізу такий. Приблизно 0,25 г сухого йодату срібла додають у конічні колби з притертими пробками ємністю 50 мл, у які переносять розчин із мірчих колб (25 мл), не змиваючи залишки зі стінок. Колби щільно закривають і струшують протягом 5 хв. За цих умов відбувається реакція між іонами бромру, хлору та йодатом срібла. Кількість йодату як окисника визначається йодометрично. Для цього розчин, що міститься в колбі, фільтрують у чисту суху колбу через фільтр, вільний від хлоридів. Беруть піпеткою три проби фільтрату і переносять у конічні колби ємністю 50 мл. У кожену колбу додають по дві краплі 0,9085 М розчину H_3PO_4 та 1 мл 10 % розчину KI. Розчини в колбах струшують протягом 5 хв, за цих умов виділяється вільний йод. Кількість йоду визначається титруванням 0,01 N розчином тіосульфату натрію. Титрування спочатку проводять до появи жовтого кольору, наприкінці в колби додають 0,5 мл 1 % розчину крохмалю і титрують до зникнення синього забарвлення.

Контрольне визначення проводять щоразу за умови використання нової порції приготованого 4 % розчину сульфідру натрію. Під час контрольного визначення у мірчі колби ємністю 25 мл вносять 6 мл розчину Na_2S , 5 мл води, 2 мл 2 М H_3PO_4 і примішують кілька зерен кварцу або шматочків битого скла. Вміст колби кип'ятять протягом 5 хв, охолоджують і далі аналіз проводять так само, як зазначено вище. Значення контрольного титрування виводять на основі середнього значення чотирьох визначень.

Кількість йодату, що міститься в аналізованому зразку (25 мл), розраховують за формулою:

$$X = \frac{a \times T \times 100 \times 25}{6 \times V},$$

де:

X – кількість ммоль йодату;

a – кількість 0,0 N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, витрачена на титрування зразка, мл;

T – поправка до титру 0,01 N розчину $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$;

100 – коефіцієнт на передачу 0,01 N Na₂S₂O₃ у 1 N розчин;

6 – кількість атомів вільного йоду, що виділяються на іон IO₃⁻;

Вміст лимонної кислоти у рослинному матеріалі обчислюють за формулою:

$$A = \frac{(X - X_1) \times 38,424}{q},$$

де:

A – вміст лимонної кислоти у рослинному зразку, мг;

X – кількість йодату калію, що міститься у дослідній витяжці, mM;

X₁ – кількість йодату, що міститься у контрольному зразку, mM;

q – емпірично знайдений коефіцієнт, що дорівнює 0,980;

38,424 – коефіцієнт, який становить 1/5 молекулярної маси лимонної кислоти, яка вводиться тому, що 1 моль пентабромацетону дає 1 г-екв бром.

Обладнання

1) водяна баня; 2) колби ємністю 100 і 500 мл; 3) скляні фільтри-тиглі № 4; 4) вакуумний насос; 5) мірчі колби ємністю 25, 50, 100, 200 мл та 1 л; 6) конічні колби ємністю 25 і 50 мл; 7) ділильні лійки; 8) мікробюретки; 9) хімічні склянки; 10) піпетки.

Реактиви

1) сірчана кислота (H₂SO₄) 18 N розчин; 2) бромід калію (KBr) 1 M розчин; 3) фосфорна кислота (H₃PO₄) 2 M, 0,85 M і 0,085 M та 20 % розчини; 4) тіосульфат натрію (Na₂S₂O₃) 0,1 N та 0,01 N розчини; 5) пероксид водню (H₂O₂) 3 % розчин; 6) перманганат калію (KMnO₄) 1,5 N розчин; 7) сульфід натрію (Na₂S·9H₂O) 4 % розчин; 8) хлорид калію (KCl) 0,0125 M розчин у 0,085 M H₃PO₄; 9) йодид калію (KI) або натрію (NaI) 10 % розчин; 10) йодид калію (KI) сухий; 11) крохмаль 1 % розчин; 12) фосфорновольфрамова кислота (H₂WO₄) 5 % розчин; 13) нітрат срібла (AgNO₃) сухий; 14) петролейний ефір; 15) бром (Br₂) насичений розчин (бромна вода); 16) йодат срібла (AgIO₃).

Приготування реактивів

Реактив № 8 (0,0125 M розчин хлориду калію). Для приготування розчину KCl зважують точно 0,9319 г висушеної солі, розчиняють у 0,085M H₃PO₄ і цим розчином доводять об'єм розчину до 1 л.

Реактив № 16 (розчин йодату срібла). У хімічній склянці ємністю 2–3 л розчиняють 23 г KIO₃ і доводять об'єм розчину водою приблизно до 600 мл. 18 г AgNO₃ розчиняють у 400 мл води. Далі розчин AgNO₃ додають краплями у розчин KIO₃ під час постійного перемішування рідини у склянці. Прозорий розчин зливають, а осад переносять на великий скляний фільтр-тигель № 4. Осад на фільтрі багаторазово промивають водою для видалення надлишку KIO₃. Після 8–10 промивань з кожного фільтрату беруть по 10 мл у пробірку і змішують із декількома краплями 0,85 M H₃PO₄ і декількома краплями 5 % розчину KI. Під

час цього з'являється жовте забарвлення. Продовжують промивання до тих пір, поки інтенсивність забарвлення в послідовних фільтратах не стане незмінною. Після цього осад сушать у вакуумному ексикаторі за кімнатної температури, подрібнюють у порошок і зберігають в ексикаторі у темній пляшці.

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАТЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Як будову має лимонна (цитратна) кислота? До якої групи органічних кислот вона належить?
2. У яких процесах життєдіяльності рослин бере участь лимонна кислота? Наведіть метаболічні цикли з участю лимонної кислоти.
3. Охарактеризуйте принцип методу визначення лимонної кислоти у рослинному матеріалі.
4. Наведіть послідовність виконання аналізу. Для чого потрібне титрування контрольного зразка?
5. Як проводиться обчислення вмісту лимонної кислоти у рослинному матеріалі?

РОБОТА 12.5. ВИЗНАЧЕННЯ ЛИМОННОЇ КИСЛОТИ (ЗА Х. Н. ПОЧИНКОМ)

Лимонна кислота міститься у фруктах і ягодах (від 0,2 до 3 %), особливо багато її в лимонах (6–8 %).

Принцип методу. Лимонну кислоту вилучають розведеною сірчаною кислотою і в отриманому розчині окислюють перманганатом калію за наявності броміду калію для утворення пентабромацетону, який екстрагують хлороформом і розкладають сульфідом натрію. Кількість броміду, еквівалентну вмісту лимонної кислоти, визначають аргентометричним або меркуриметричним методом.

Перебіг аналізу. Беруть таку наважку рослинного матеріалу, щоб у ній містилось від 5 до 40 мг лимонної кислоти (листя рослин 1 г, свіжі ягоди приблизно 1 г), ретельно розтирають у ступці з 1 мл розчину сірчаної кислоти (1 : 9). У розтерту масу додають 5 мл дистильованої води, знову розтирають і переносять весь вміст у мірчу колбу об'ємом 25 мл, змиваючи залишок водою. У колбу вносять 2 мл 4 % розчину фосфорновольфрамівної кислоти та збовтують протягом 5 хв. Далі доводять об'єм екстракту дистильованою водою до мітки, перемішують та залишають на деякий час для просвітлення розчину (можна залишити на ніч). Після цього фільтрують у суху колбу через сухий складений фільтр. Із отриманого фільтрату піпеткою відбирають 5 мл (у взятому екстракті повинно бути 1–8 мг лимонної кислоти), примішують у пробірку діаметром приблизно 20 мм, додають 1 мл розчину сірчаної кислоти (1 : 9), 1 мл 12 % розчину броміду калію і перемішують. Далі додають 2 мл 4 % розчину перманганату калію, перемішують.

ють і залишають у витяжній шафі на 10 хв за умови періодичного струшування пробірки. Внаслідок реакції розчин набуває коричневого кольору через виділений діоксид марганцю. Якщо розчин знебарвлюється, додають ще 0,5 мл 4 % розчину перманганату. Далі для розчинення діоксиду марганцю додають 2 мл 20 % розчину сірчаноокислого закисного заліза (або солі Мора). Якщо після збовтування розчин не знебарвлюється, додають краплями сірчаноокислого закисного заліза до повного знебарвлення. Після цього для відновлення надлишку бром у додають ще 1 мл розчину сірчаноокислого закисного заліза і вміст пробірки переносять у ділильну ліжку ємністю 100 мл, промиваючи пробірку дистильованою водою.

Для вилучення отриманого пентабромацетону у ділильну ліжку додають 5 мл хлороформу, попередньо промивши пробірку хлороформом, струшують її 1 хв і дають постояти 2–3 хв, щоб відокремити хлороформ, і зливають нижній шар у конічну колбу об'ємом 100 мл. Під час цього необхідно акуратно відокремити хлороформ від решти рідини, щоб у колбу не потрапила жодна крапля водного розчину. До розчину, що залишився в ділильній ліжці, додають ще 5 мл хлороформу, струшують 1 хв, дають розчину розділитися і зливають нижній шар, акуратно відокремивши його від водного шару, в колбу з хлороформним екстрактом. У тому випадку, коли дослідний розчин містить каламуть пентабромацетону, під час вилучення хлороформу у ньому утворюються стійкі пухирці, які важко видалити. У цьому випадку хлороформ відокремлюють разом із бульбашками, а потім промивають дистильованою водою для видалення бромідів. Для цього після екстракції та відокремлення нижнього шару ділильна ліжка звільняється від розчину і промивається водою. Розчин хлороформу у колбі знову приміщують у ділильну ліжку. Колбу промивають 20 мл води, яку також вносять у ділильну ліжку. Ліжку з рідиною струшують 1 хв, дають шарам відокремитися протягом 3 хв і нижній шар зливають у ту саму колбу навіть за наявності пухирців.

До отриманого розчину пентабромацетону у хлороформі, який міститься в колбі, додають 1 мл 10 % розчину сульфату натрію. Колбу приміщують на водяну баню з водою у витяжну шафу і нагрівають до видалення хлороформу. Далі додають 20 мл дистильованої води, розчин переносять на плитку, нагрівають до кипіння і кип'ятять 2 хв. Під час цього відбувається розкладення пентабромацетону та утворення броміду натрію. У отриманому розчині бромід визначають аргентометричним методом. Для цього після охолодження розчину додають 2 мл 20 % розчину персульфату амонію, дві краплі індикатору еозину з метиленовим синім і титрують 0,01 N розчином нітрату срібла до переходу кольору у рожево-фіолетовий.

Також як індикатор можна використовувати роданід заліза. У цьому разі в колбу, що містить охолоджений водний розчин броміду і сульфату натрію, нали-

вають 1 мл азотної кислоти (1 : 1), краплями струшуванням 4 % розчин перманганату калію до появи жовтого або рожевого забарвлення, яке знебарвлюється додаванням 1–2 крапель 10 % розчину сульфату натрію. Після цього додається ще 2 мл азотної кислоти (1 : 1), 1 мл 20 % розчину залізоамонійних квасців, 1 мл 0,01 N розчину роданіду калію і розчин червоного кольору титрують 0,01 N розчином нітрату срібла до знебарвлення індикатору. Замість азотнокислого срібла можна використовувати також азотнокислу закисну ртуть, титруючи 0,01 N розчином $\text{Hg}_2(\text{NO}_3)_2$ до тих пір, поки колір роданіду заліза повністю не зникне. Для визначення поправки на індикатор до вже титрованого дослідного розчину додають 1 мл 0,01 N розчину роданіду калію і титрують 0,01 N розчином AgNO_3 або $\text{Hg}_2(\text{NO}_3)_2$ до знебарвлення. Результат титрування слугує поправкою і віднімається від об'єму розчину азотної кислоти срібла або азотнокислої закисної ртуті, витрачений на титрування дослідного розчину.

Вміст лимонної кислоти розраховується за формулою:

$$X = \frac{3,842 \times V_1 \times K \times V_3}{n \times V_2},$$

де:

X – вміст безводної лимонної кислоти в досліджуваній речовині, %;

V_1 – загальний об'єм екстракту, мл;

V_2 – об'єм витяжки, взятий для визначення лимонної кислоти, мл;

V_3 – об'єм титрованого розчину нітрату срібла або нітрату ртуті, витраченого на титрування, мл;

K – нормальність титрованого розчину AgNO_3 або $\text{Hg}_2(\text{NO}_3)_2$;

n – наважка досліджуваного рослинного матеріалу, г;

3,842 – нормальний титр лимонної кислоти, помножений на 100 для перерахунку у відсоток.

Обладнання

1) аналітичні терези; 2) фарфорові ступки з товчачиками; 3) мірчі колби об'ємом 25 мл; 4) конічні колби; 5) ділільні лійки; 6) бюретки для титрування; 7) мірчі піпетки.

Реактиви

1) сірчана кислота (H_2SO_4), розведена дистильованою водою 1:1 за об'ємом; 2) бромід калію (KBr) 12 % розчин; 3) фосфорновольфрамова кислота ($\text{H}_7\text{O}_{42}\text{PW}_{12}\cdot n\text{H}_2\text{O}$) 4 % розчин; 4) перманганат калію (KMnO_4) 4 % розчин; 5) сірчаноокисле закисне залізо (FeSO_4) або сіль Мора 20 % розчин; 6) сульфат натрію (Na_2SO_4) 10 % розчин; 7) хлороформ; 8) персульфат амонію ($(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$) 20 % розчин; 9) комбінований індикатор; 10) нітрат срібла (AgNO_3) 0,01 N розчин; за умови використання для титрування нітрату ртуті – 8а) азотна кислота (HNO_3), розведена дистильованою водою 1:1; 9а) залізоамонійні квасці 20 % розчин;

10а) роданід калію (KSCN) 0,01 N розчин; 11а) нітрат закисної ртуті ($\text{Hg}_2(\text{NO}_3)_2$) 0,1 N розчин.

Приготування реактивів

Реактив № 5 (20 % розчин сульфату заліза ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) або солі Мора ($\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)). Зважують 50 г і додають 200 мл дистильованої води, 5 мл сірчаної кислоти густиною 1,84. Сіль розчиняють і доводять об'єм водою до 250 мл. Отриманий розчин зберігається протягом тижня.

Реактив № 9 (комбінований індикатор). Зважують 0,5 г солі еозину натрію і 0,2 г метиленового синього, розчиняють у дистильованій воді і доводять об'єм водою до 100 мл.

Реактив № 10 (0,05 N розчин нітрату срібла). Зважують на аналітичних терезах 4,25 г нерозкладеної солі AgNO_3 , попередньо висушеної за 100 °C, розчиняють у дистильованій воді і доводять об'єм розчину дистильованою водою в мірчій колбі до 500 мл. Розчин зберігається у темній пляшці. Перед аналізом із вихідного розчину готують 0,01 N розчин, розводячи вихідний у 5 разів.

Розчин № 9а (20 % розчин залізоамонійних квасців). Зважують 20 г солі $\text{Fe}(\text{NH}_4)(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, приміщують у склянку, додають 70 мл дистильованої води, 10 мл азотної кислоти (1 : 1), нагрівають до розчинення солі, охолоджують, доводять об'єм розчину дистильованою водою до 100 мл і перемішують.

Реактив № 10а (0,1 N розчин роданіду калію). 1 г безводної солі KSCN або 0,8 г NH_4SCN розчиняють у дистильованій воді і доводять об'єм розчину дистильованою водою до 100 мл. Із цього розчину готують 0,01 N розчин, розводячи воду у 10 разів.

Реактив № 11а (0,01 N розчин нітрату ртуті закисної). Зважують $\text{Hg}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, приміщують у склянку, додають 10 мл азотної кислоти (1 : 1) та 100 мл дистильованої води, розчиняють і доводять об'єм розчину водою до 1 л. Розчин переносять у пляшку з темного скла, додають 10 крапель металевої ртуті і зберігають у добре закритій пляшці.

За відсутності азотнокислої закисної ртуті її розчин можна приготувати з металевої ртуті у певний спосіб. Зважують 15 г металевої ртуті у скляній хімічній склянці, додають 10 мл дистильованої води і 14 мл азотної кислоти (1 : 1). Склянку приміщують на киплячу водяну баню і нагрівають до розчинення більшої частини ртуті. Отриману рідину залишають на ніч. На другий день розводять водою до 100 мл і зберігають у темному місці. Так отримують приблизно 0,5 N розчин. Із цього розчину готують робочий розчин 0,01 N. Для цього беруть 10 мл 0,5 N розчину, вносять у мірчу колбу об'ємом 500 мл, додають 5 мл азотної кислоти (1 : 1), об'єм розчину доводять водою до 500 мл, перемішують, переливають у темну пляшку і додають 5 крапель металевої ртуті.

Нормальність отриманого розчину встановлюється за допомогою 0,01 N розчину броміду калію. Для цього зважують на аналітичних терезах 0,595 г по-

передньо висушеної солі KBr, розчиняють у воді у мірчій колбі об'ємом 500 мл, доводять об'єм розчину водою до мітки і перемішують. Відбирають піпеткою 20 мл цього розчину у колбу для титрування, вносять 1 мл 20 % розчину залізоамонійних квасців, 1 мл розчину роданіду калію і забарвлений у червоний колір розчин титрують розчином нітрату закисної ртуті до повного знебарвлення. Від об'єму розчину, який витрачено на титрування, віднімають 1 мл, який витрачається на нейтралізацію 1 мл роданіду калію. Нормальність отриманого розчину обчислюється за такою формулою:

$$K = \frac{0,01 \times 20}{a},$$

де:

K – нормальність розчину нітрату закисної ртуті, мл;

a – об'єм розчину нітрату закисної ртуті, витрачений на титрування розчину броміду калію;

20 – об'єм броміду калію, взятий для титрування, мл;

0,01 – нормальність розчину броміду калію.

Нормальність розчину нітрату закисної ртуті періодично перевіряється за результатами титрування розчину броміду калію.

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАТЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Яка будова молекули лимонної кислоти?
2. Охарактеризуйте принцип методу визначення лимонної кислоти за Х. Н. Починком.
3. Наведіть основні етапи виконання роботи. Які речовини можна використовувати для титрування?
4. Чим відрізняється методика титрування нітратом срібла від титрування нітратом закисної ртуті?
5. Як установлюється нормальність розчину нітрату закисної ртуті?

РОБОТА 12.6. ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ЯБЛУЧНОЇ КИСЛОТИ В РОСЛИННОМУ МАТЕРІАЛІ

Один із найбільш точних методів визначення яблучної кислоти був розроблений Пучером і Вікері.

Принцип методу. Із рослинного матеріалу яблучна кислота екстрагується за допомогою ефіру і в кислому розчині за наявності броміду калію перетворюється за допомогою перманганату натрію в похідне брому. Бромпохідне яблучної кислоти може бути дистильоване з водяною парою; з 2,4-динітрафенілгідрaziном сполука утворює нерозчинний осад гліоксала-2,4-динітрофеніл-озазон оранжево-жовтого кольору. Після зміни кислотності розчину шляхом додавання

лугу розчин озазону в піридині утворює сполуку синього кольору, інтенсивність забарвлення якої пропорційна кількості яблучної кислоти. Інтенсивність забарвлення розчину визначається на спектрофотометрі або фотоелектроколориметрі.

Перебіг аналізу. Наважку 2–10 г (цей метод дає змогу виявити 0,2–2,0 мг яблучної кислоти, тому наважка для аналізу повинна містити саме таку кількість кислоти) сухого рослинного матеріалу ретельно подрібнюють, переносять у фарфорову ступку і розтирають у присутності 4–5 мл 25 % сірчаної кислоти і залишають стояти на ніч. Сірчану кислоту необхідно додавати, щоб перетворити солі органічних кислот у вільні кислоти. На наступний день вологу масу для зневоднення ретельно протирають порошком безводного сульфату натрію і залишають стояти на ніч. Під час визначення яблучної кислоти у свіжому рослинному матеріалі до подрібненої рослинної маси необхідно додати 4 N сірчану кислоту, а після настоювання у ступці суміш зневоднюють безводним сульфатом натрію.

Визначенню яблучної кислоти можуть заважати вуглеводи та деякі амінокислоти, тому екстракцію необхідно проводити очищеним безводним ефіром, а не водою. Сухий порошок кількісно переноситься у паперовий картридж, який приміщують в екстрактор апарата Сокслета, кислоти вилучають ефіром протягом 36 год. Ефірний екстракт переносять у ділильну лійку та декілька разів струшують із водою для повного переходу органічних кислот у водну фазу.

Водний екстракт переносять у широку склянку ємністю приблизно 200 мл і нагрівають на водяній бані під тягою до повного видалення слідів ефіру. Розчин переносять у мірчу колбу об'ємом 200 мл, декілька разів змиваючи склянку водою, і нейтралізують 5 N розчином гідроксиду натрію з використанням фенолфталеїну. Об'єм розчину доводять водою до мітки та фільтрують у чисту суху колбу. Фільтрат використовують для визначення яблучної кислоти. Цю витяжку можна також використовувати і для визначення інших органічних кислот.

Для визначення яблучної кислоти беруть 20 мл фільтрату та додають 4 мл 20 N H_2SO_4 . Розчин обережно кип'ятять протягом 5 хв, щоб видалити останні сліди ефіру та інших летких речовин. Після охолодження в розчин додають 1 мл насиченої бромової води. Через 5 хв суміш фільтрують у колбу об'ємом 100 мл, яка має мітку 35 мл, з використанням вакуумного насоса через скляний фільтр № 4. Фільтр промивають невеликими порціями дистильованої води, доки об'єм рідини в колбі не складе приблизно 35 мл. Об'єм розчину в колбі доводять водою рівно до 35 мл. Після цього в колбу вносять 2 мл 1 M розчину бромиду калію. Колбу ставлять на водяну баню з температурою точно 20 °C, витримують 10 хв, після чого в розчин доливають 5 мл 1,5 N KMnO_4 і ще витримують 5–10 хв, періодично перемішуючи рідину. Внаслідок реакції вивільняються пари бромової пари, тому цю операцію необхідно проводити у витяжній шафі. Далі колбу приміщують у хімічну склянку з льодом і охолоджують суміш до 5–10 °C. Після

цього в колбу додають охолоджений розчин перекису водню 3 % до повного знебарвлення розчину. Надлишок перекису водню видаляють шляхом додавання 0,02 N розчину перманганату калію, поки не з'явиться слабкий рожевий колір.

Під час визначення лимонна кислота, що міститься у зразку, перетворюється в пентабромацетон, який необхідно відокремити від продуктів окислення яблучної кислоти. Пентабромацетон випадає у вигляді білого осаду, який розчиняється петролейним ефіром. Для цього після закінчення реакції окислення розчин переносять у ділільну лійку об'ємом 100–150 мл. Колбу промивають декілька разів чистим петролейним ефіром, який вноситься у ділільну лійку. Суміш струшують 5–6 разів, додаючи кожного разу приблизно 5 мл петролейного ефіру. Загальний об'єм ефіру в лійці повинен бути 50–60 мл. Ділільну лійку енергійно струшують і після розділення шарів водну фазу кількісно переносять у мірчу колбу ємністю 100 мл. Петролейний ефір промивають у ділільній лійці 3–4 рази водою (по 3–5 мл кожного разу) і промивні води зливають у мірчу колбу. Розчин у колбі доводять до мітки дистильованою водою, а решту ефірного екстракту використовують для кількісної оцінки лимонної кислоти. Після видалення пентабромацетону з мірчої колби беруть 50 мл розчину і переносять у колбу для перегонки (рис. 45). Для приготування розчину 2,4-динітрофенілгідразину у фарфорову чашку примішують 5 г цієї речовини і розчиняють, додаючи невеликі порції соляної кислоти (200 мл HCl на 800 мл води), суміш кип'ятять у чашці протягом 2 хв, після охолодження розчин розводять водою до 1 л і фільтрують.

Перегонка проводиться у пристрої водяною парою. Необхідно, щоб усі з'єднання колби і холодильника були ретельно прищліфовані. Перегонка проводиться з сильним нагріванням до тих пір, поки в колбі не залишиться 5–10 мл рідини. Воду через холодильник пропускають тільки перші 5–7 хв, а далі він закривається, і перегонка триває. Під час перегонки у приймачі утворюється оранжево-жовтий осад озанону. Після закінчення перегонки приймач з осадом від'єднати від дистиляційної трубки, попередньо промиваючи трубку струмом проточної води, щоб сліди осаду, прилиплі до трубки, змивалися до приймача.

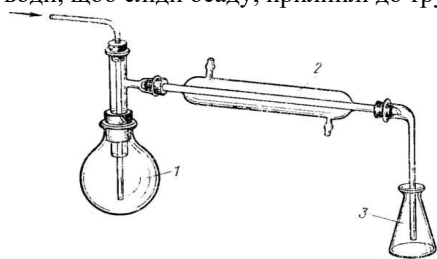


Рис. 45. Пристрій для перегонки водяною парою: 1 – колба з круглим дном, 2 – холодильник, 3 – приймач

Далі готують пристрій для фільтрації. Для цього беруть трубку Алена, закладають у неї на $\frac{1}{5}$ висоти скляну вату та азбест і прикріплюють її до колби Бунзена для фільтрації під вакуумом. Осад переносять максимально повністю у трубку Алена і промивають приймач і трубку водою до тих пір, поки промивна вода не буде злегка забарвлюватися. Трубку Алена при-

мішують у термостат і її вміст висушують за температури 105–110 °С. Після висихання трубку Алена приєднують до вакуумного насоса і осад гліюксал-2,4-динітрофенілозону розчиняють у киплячому піридині. Для цього у трубку Алена наливають 5–8 мл киплячого піридину і під час перемішування скляною паличкою проводять розчинення. Після розчинення осаду трубку Алена промивають під вакуумом 3–4 порціями киплячого піридину (по 3–4 мл кожна) і отриманий розчин піридину переносять у мірчу колбу об'ємом 25 мл. Розчин у колбі охолоджують до 20 °С, додають піридин до позначки і перемішують.

2 або 5 мл досліджуваного піридинового розчину (залежно від передбачуваного вмісту яблучної кислоти) переносять у мірчу колбу ємністю 100 мл, наливають 50 мл води і 5 мл 5 N гідроксиду натрію. Під час цього з'являється блакитне або синє забарвлення, яке не зникає протягом двох годин. Об'єм розчину у колбі доводять водою до мітки та вимірюють оптичну густину розчину за довжини хвилі 570 нм. Для розрахунків використовують калібрувальний графік, який будується за стандартним розчином яблучної кислоти.

Побудова калібрувального графіка

Для приготування стандартного розчину чисту, двічі перекристалізовану яблучну кислоту сушать у вакуумному ексікаторі над сірчаною кислотою. Наважку 200 мл підготовленої в такий спосіб яблучної кислоти розчиняють у 100 мл 1 N розчину сірчаної кислоти (H₂SO₄). Із цього розчину беруть 5 мл і переносять у мірчу колбу об'ємом 100 мл; це відповідає 10 мг яблучної кислоти. Далі в колбу додають 2 мл 1 N розчину KBr, охолоджують до 20–22 °С і додають 5 мл 1,5 N розчину перманганату калію. Після охолодження вмісту колби до 8–10 °С реакційну суміш знебарвлюють 3 % розчином перманганату калію і проводять дистиляцію, як було вказано вище. Суміш переганяють у колбу, що містить 25 мл розчину 2,4-динітрофенілгідазину. Отриманий оранжево-жовтий осад озазону фільтрують і промивають у трубці Алена. Далі осад розчиняють у гарячому піридині, переносять у мірчу колбу на 25 мл і доводять піридином до мітки. У 5 мірчих колб ємністю 100 мл беруть 0,5; 1,0; 2,5; 5,0 і 10,0 мл розчину піридину, що відповідає 0,2; 0,4; 1,0; 2,0 і 4,0 мг яблучної кислоти. Розчини в колбах забарвлюють, додаючи 5 мл 5 N NaOH, доводять об'єм розчину піридином до мітки та визначають оптичну густину. На основі визначення оптичної густини будують калібрувальний графік.

Вміст яблучної кислоти у рослинному матеріалі обчислюється за формулою:

$$X = \frac{C \times 100}{V \times n},$$

де:

X – вміст яблучної кислоти у тестовому матеріалі, %;

C – концентрація яблучної кислоти, знайдена за калібрувальним графіком, мг/мл;

V – розведення (враховуються всі об'єми розчинів, які бралися у аналізі);

n – наважка, г;

100 – коефіцієнт перерахунку у відсотки.

Обладнання

1) спектрофотометр або фотоелектроколориметр; 2) апарат Сокслета для екстракції; 3) пристрій для перегонки рідини; 4) водяна баня; 5) колби Бунзена; 6) трубки Алена; 7) скляні фільтри № 4; 8) ділильні лійки; 9) конічні колби ємністю 50, 100 і 200 мл; 10) мірчі колби об'ємом 25, 50, 100 та 200 мл; 11) фарфорові ступки; 12) хімічні склянки ємністю 200 мл та 1 л; 13) піпетки; 14) кристалізатор.

Реактиви

1) етиловий ефір; 2) петролейний ефір; 3) сірчана кислота (H_2SO_4) 2 N та 20 N розчини; 4) бромід калію (KBr) 1 M розчин; 5) бромна вода (насичена); 6) пероксид водню (H_2O_2) 3 % розчин; 7) гідроксид натрію (NaOH) 5 N розчин; 8) сульфат натрію (Na_2SO_4) безводний; 9) піридин; 10) соляна кислота (HCl) 2,5 N розчин; 11) 2,4-динітрофенілгідразин.

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАТЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Наведіть характеристику яблучної кислоти. До якої групи органічних кислот вона належить?

2. У яких процесах життєдіяльності рослин бере участь яблучна кислота? Наведіть реакції з участю яблучної кислоти.

3. Охарактеризуйте принцип методу визначення яблучної кислоти у рослинному матеріалі.

4. Наведіть послідовність виконання аналізу.

5. Як позбутися похибки визначення вмісту яблучної кислоти через вплив наявності лимонної в рослинному матеріалі?

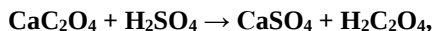
6. Як будується калібрувальний графік для визначення концентрації яблучної кислоти?

РОБОТА 12.7. ВИЗНАЧЕННЯ КІЛЬКОСТІ ЩАВЛЕВОЇ КИСЛОТИ

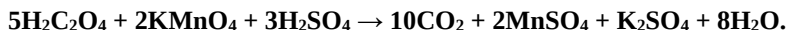
На відміну від інших органічних кислот у фруктах і ягодах, вміст щавлевої кислоти незначний (соті частки відсотка), але у старих сухих листках щавлю, шпинату, живців ревеню його кількість досягає 10–16 %. Часто щавлева кислота відкладається у тканинах рослин у вигляді кристалів оксалату кальцію, видимих під мікроскопом.

Принцип методу. Методи визначення щавлевої кислоти ґрунтуються на її виділенні з екстрактів у вигляді погано розчинного оксалату кальцію. Щавлева кис-

лота погано розчиняється у ефірі, тому для її визначення використовують екстракцію водою. Із екстракту осаджується щавлева кислота у вигляді оксалату кальцію, а її кількість визначається титруванням розчином перманганату в кислому середовищі (метод Бейкера). Під дією сірчаної кислоти осад оксалату кальцію розчиняється:



щавлеву кислоту, що звільняється під час реакції, титрують перманганатом калію:



За кількістю витраченого перманганату калію розраховується вміст щавлевої кислоти в розчині.

Перебіг аналізу. Наважку свіжого подрібненого рослинного матеріалу (30–50 г) гомогенізують зі 100 мл води. Якщо взяти на аналіз сухий матеріал, то 5 г сухого листа подрібнюють у ступці з піском. Слід враховувати, що під час висушування рослинного матеріалу за температури 100 °С є значні втрати оксалату, тому краще застосовувати ліофільне сушіння. Далі суспензію переносять у хімічну склянку ємністю 600 мл, ступку кілька разів промивають невеликими порціями води. До кожних об'ємів екстракту додають 2 об'єми 6 N HCl і одну або дві краплі октилового або каприлового спирту для запобігання утворенню піни. Суспензію кип'ятять протягом 15 хв за постійного перемішування та охолоджують. Охолоджену суспензію кількісно переносять у мірчу колбу об'ємом 500 мл і доводять об'єм рідини дистильованою водою до мітки. Розчин ретельно перемішують та залишають на ніч. Внаслідок такої екстракції в розчин переходить вільна і зв'язана у вигляді солей щавлева кислота. Якщо необхідно визначити тільки вільну кислоту, екстракція проводиться без додавання HCl. Після осідання вміст колби перемішують і фільтрують через сухий фільтр. Беруть 25 мл фільтрату та переносять у центрифугальну пробірку об'ємом 50 мл для осадження білків 5 мл фосфорновольфрамового реактиву. Суміш у центрифугальній пробірці перемішують, залишають настоятися 5 год і центрифугують протягом 10 хв за 3–4 тис. об./хв.

Після осадження білків 20 мл прозорого розчину переносять в іншу центрифугальну пробірку ємністю 50 мл. У пробірку краплями додають 18 N розчин NH_4OH до тих пір, поки розчин не стане слабколужним, що виявляється за випадінням незначного осаду фосфоровольфрамату. Після цього проводять осадження оксалату кальцію. Для цього у пробірку наливається 5 мл буферного розчину хлористого кальцію. Після додавання буферного розчину CaCl_2 суміш перемішують скляною паличкою і залишають на ніч у холодильнику за температури 5 °С. За цих умов випадає осад оксалату кальцію CaC_2O_4 . Після цього суміш центрифугують протягом 10 хв за 3 тис. об./хв. Рідина над осадом ретельно зливається, а осад промивається 20 мл промивного розчину під час перемішування

тонкою скляною паличкою для розчинення забруднюючих речовин. Центрифугальну пробірку приміщують на киплячу водяну баню і щавлеву кислоту титрують 0,02 N перманганатом калію (KMnO_4) до появи слабкого рожевого забарвлення, яке не зникне протягом 1 хв.

Для обчислення результатів враховують, що 1 мл 0,02 N KMnO_4 відповідає 0,9 мг безводної щавлевої кислоти. 20 мл вільного від білка екстракту відповідає 2 г (2 000 мг) рослинного матеріалу. Тому для обчислення застосовують таку формулу:

$$X = \frac{a \times T \times 0,9 \times 100}{2000},$$

де;

X – вміст щавлевої кислоти, %;

a – кількість 0,02 N KMnO_4 , витрачена на титрування, мл;

T – поправка до титру KMnO_4 ;

100 – коефіцієнт для перетворення у відсоток.

Обладнання

1) центрифуга; 2) центрифугальні пробірки ємністю 50 мл; 3) холодильник; 4) гомогенізатор; 5) водяна баня; 6) хімічні склянки ємністю 600 мл; 7) мірчі колби ємністю 500 мл та 1 л; 8) бюретки; 9) лійки; 10) фільтри; 11) піпетки.

Реактиви

1) соляна кислота (HCl) 6 N розчин; 2) фосфорно-вольфрамовий реактив; 3) аміак (NH_4OH) 18 N розчин; 4) сірчана кислота (H_2SO_4) 3,5 N розчин; 5) перманганат калію (KMnO_4) 0,02N розчин; 6) хлорид кальцію (CaCl_2) буферний розчин; 7) промивний розчин; 8) каприловий або октиловий спирт.

Приготування реактивів

Реактив № 2 (фосфорно-вольфрамовий реактив). Зважують 24 г вольфраму натрію, доливають 40 мл ортофосфornoї кислоти (густина 1,75) і додають дистильовану воду до 1 л.

Реактив № 6 (буферний розчин хлориду кальцію (CaCl_2)). Готують шляхом розчинення 25 г безводного хлористого кальцію в 500 мл суміші, що складається з 250 мл льодяної оцтової кислоти і 250 мл води. Цей розчин додають у 500 мл розчину ацетату натрію (330 г CH_3COONa розчиняють у воді і доводять до 500 мл). Після приготування реактив витримують 2 дні за 4–7 °C і фільтрують.

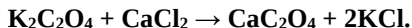
Реактив № 7 (промивний розчин). Змішують 5 % розчин оцтової кислоти з невеликою кількістю оксалату кальцію, який осідає на дно. Перед використанням розчин фільтрують через щільний фільтр і центрифугують протягом 10 хв.

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

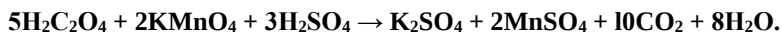
1. Дайте характеристику будови молекули щавлевої кислоти. Наведіть класифікацію органічних кислот та місце щавлевої кислоти у цій класифікації.
2. Яку роль відіграє щавлева кислота у фізіолого-біохімічних процесах рослинних організмів?
3. У чому полягає принцип визначення щавлевої кислоти у рослинному матеріалі?
4. Наведіть порядок виконання аналізу.

РОБОТА 12.8. ВИЗНАЧЕННЯ ЩАВЛЕВОЇ КИСЛОТИ (ЗА Х. Н. ПОЧИНКОМ)

Принцип методу. Щавлева кислота міститься в основному в кислиці та щавлі у вигляді кислій калійної солі, а в більшості інших рослин – у вигляді оксалату кальцію. Наявність вільної щавлевої кислоти в рослинах не доведена. У невеликій кількості вона міститься у малині, чорній смородині, порічці, суниці, вишні та груші – від 0,01 до 0,05 %. У рослинах можна визначити водорозчинні оксалати – нейтральні і кислі солі калію, та водонерозчинні оксалати – сіль кальцію. Розчинні солі щавлевої кислоти вилучають теплою водою, білки видаляють із розчину оцтовою кислотою і осаджують щавлеву кислоту хлористим кальцієм:



Після відділення осаду центрифугуванням і промиванням його водою осад розчиняється в сірчаній кислоті і щавлева кислота титрується перманганатом калію у присутності сірчаної кислоти, що прискорює реакцію і знижує окисний потенціал перманганату, зменшуючи похибку, викликану органічними домішками:



У залишку після екстракції водорозчинних солей щавлевої кислоти визначається вміст оксалату кальцію. Його розчиняють у соляній кислоті та осаджують щавлеву кислоту хлоридом кальцію у аміачному середовищі для відокремлення від розчинних у соляній кислоті домішок. Після промивання осаду дистильованою водою та розчинення його в сірчаній кислоті кількість щавлевої кислоти визначають перманганатометричним методом.

Перебіг аналізу. Зважують 0,4–1 г ретельно подрібненого сухого рослинного матеріалу (або відповідної кількості свіжого матеріалу), примішують у фарфорову ступку і розтирають із 5 мл дистильованої води до однорідної маси. Вміст ступки переносять у центрифугальну пробірку ємністю 20 мл, промиваючи ступку 10 мл води, і об'єднують промивну рідину з основним розчином. Пробірку примішують у воду, нагріту до температури 60 °С, і витримують 10 хв за умови частого помішування. Далі центрифугують і прозорий розчин заливають у склян-

ку ємністю 50 мл. Залишок обробляють теплою водою ще 2 рази порціями по 10 мл, кожного разу перемішуючи вміст пробірки протягом 5 хв і центрифугуючи. Центрифугати об'єднуються. Отриманий розчин нагрівають у склянці до кипіння, знімають із плитки, додають 10 крапель льодяної оцтової кислоти, перемішують і центрифугують для видалення осаду. Прозорий розчин заливають у чисту склянку. Осад у ступці і пробірці заливають 5 мл 1 % розчину оцтової кислоти, центрифугують і промивну рідину додають у розчин у склянці.

Визначення водорозчинних солей щавлевої кислоти. У отриманому розчині осаджують щавлеву кислоту. Для цього розчин нагрівають майже до кипіння, додають 2 мл 25 % розчину хлориду кальцію і продовжують нагрівати на повільному вогні за умови перемішування 5 хв. Склянку знімають із плитки і залишають на 2 год або на ніч для повного осадження. Далі розчин відокремлюють від осаду центрифугуванням. Розчин відкидають, а осад, який приміщують у центрифугальну пробірку, промивають водою 3 рази порціями по 5 мл, попередньо промиваючи склянку, в якій проводилось осадження.

Промитий осад розчиняють у 5 мл розчину сірчаної кислоти (1 : 9). Розчин переносять у колбу для титрування, змиваючи залишки 20 мл дистильованої води. У розчин додають 1 мл 10 % розчину сульфату марганцю, нагрітого до 60–70 °С, і титрують 0,01 N розчином перманганату калію до появи рожевого забарвлення, яке не зникає протягом декількох секунд. Кількість щавлевої кислоти у водорозчинних оксалатах розраховується за такою формулою:

$$X = \frac{4,5 \times K \times a}{n},$$

де:

X – вміст безводної щавлевої кислоти у водорозчинних оксалатах на суху речовину, %;

a – об'єм розчину перманганату калію, витраченого на титрування щавлевої кислоти, мл;

K – нормальність розчину перманганату калію;

n – наважка сухого рослинного зразка, г;

4,5 – нормальний титр безводної щавлевої кислоти, помноженої на 100 для перетворення на відсоток.

Визначення оксалату кальцію. До залишку дослідної речовини у центрифугальній пробірці додають 1 мл 1 N розчину соляної кислоти та 15 мл дистильованої води, перемішують і приміщують у гарячу воду (приблизно 70 °С) на 10 хв за умови періодичного помішування. Далі вміст центрифугують і розчин зливають у склянку об'ємом 50 мл. Залишок обробляють ще 2 рази 0,1 N соляною кислотою порціями по 10 мл під час нагрівання протягом 5 хв на водяній бані за умови помішування. Після кожної обробки соляною кислотою розчини центри-

фугують і кислотні витяжки об'єднують. Для осадження щавлевої кислоти до отриманого солянокислого розчину додають 2 мл 25 % розчину хлориду кальцію, нагрітого до 70–80 °С, додають одну краплю метилоранжу і додають концентрований розчин гідроксиду амонію краплями до появи каламуті. Розчин нагрівають 1–2 хв за умови помішування для утворення більш великих кристалів, далі, продовжуючи нагрівання, додають краплями розчин аміаку до тих пір, поки забарвлення індикатору не зміниться на жовте. Після цього розчин нагрівають ще 5–10 хв і залишають на 2 год або на ніч.

Після відстоювання вміст пробірки центрифугують, прозорий розчин видаляють, а осад промивають 1 раз 10 мл дистильованої води. Після видалення надосадової рідини до осаду додають 10 мл 2 N розчину сірчаної кислоти, перемішують, нагрівають у киплячій воді 3–5 хв за умови розмішування, центрифугують і розчин зливають у колбу для титрування. Залишок промивають ще 1 раз 10 мл 2 N сірчаної кислоти, центрифугують, і розчин додають до першої проби в колбу. Розчин нагрівають до 60–70 °С, додають 1 мл 10 % розчину сульфату марганцю і титрують 0,01 N розчином KMnO_4 до появи рожевого забарвлення, яке не зникає протягом декількох секунд. 1 мл 0,01 N розчину перманганату калію відповідає 0,45 мг $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$. Кількість щавлевої кислоти, зв'язаної з іонами кальцію, розраховується за тією самою формулою, що і кількість щавлевої кислоти, яка міститься в рослинах у вигляді розчинних у воді солей. Для перерахунку на оксалат кальцію отриманий результат помножують на 1,422. Кількість $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$, що визначається цим методом, знаходиться у межах від 2 до 20 мг. Якщо потрібно визначити загальний вміст розчинних і нерозчинних у воді сполук щавлевої кислоти, екстракція водою не проводиться, але всі солі щавлевої кислоти екстрагуються одночасно з соляною кислотою, як під час визначення оксалату кальцію.

Обладнання

1) фарфорові ступки з товчачиками; 2) центрифугальні пробірки; 3) центрифуга; 4) хімічні склянки ємністю 50 мл; 5) бюретки для титрування; 6) піпетки.

Реактиви

1) хлорид кальцію (CaCl_2) 25 % розчин; 2) сірчана кислота (H_2SO_4) 2 N розчин; 3) сульфат марганцю (MnSO_4) 10 % розчин; 4) перманганат калію (KMnO_4) 0,01 N розчин; 5) соляна кислота (HCl) 1 N розчин; 6) метилоранж; 7) гідроксид амонію (NH_4OH) концентрований.

Приготування реактивів

Реактив № 1 (25 % розчин хлориду кальцію). Зважують 50 г кристалічної солі $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, розчиняють у дистильованій воді та доводять об'єм водою до 200 мл.

Реактив № 2 (2 N розчин сірчаної кислоти). У мірчу колбу об'ємом 500 мл наливають приблизно половину колби дистильованої води, додають 27 мл сір-

чаної кислоти густиною 1,84, перемішують, охолоджують, доводять об'єм дистильованою водою до мітки і знову перемішують.

Реактив № 3 (10 % розчин сульфату марганцю). 10 г сульфату марганцю ($\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) розчиняють у дистильованій воді та доводять об'єм розчину водою до 100 мл.

Реактив № 4 (0,01 N розчин перманганату калію). Для його приготування спочатку готують 0,05 N титрований розчин перманганату калію. Для цього зважують 3,2 г KMnO_4 , розчиняють у гарячій воді, доводять об'єм розчину до 2 л, дають постояти 2–3 дні і зливають прозорий розчин або фільтрують через скляний фільтр. Нормальність розчину перманганату калію визначають за щавлевою кислотою. З цією метою готують 0,05 N розчин щавлевої кислоти: зважують на аналітичних терезах 0,7875 г $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, розчиняють у воді, переносять у мірчу колбу ємністю 250 мл, доводять об'єм розчину водою до мітки та перемішують. 25 мл отриманого розчину відбирають піпеткою у колбу для титрування, додають 5 мл розчину сірчаної кислоти (1 : 9), нагрівають до 70–75 °C і титрують розчином перманганату калію до появи рожевого забарвлення, яке не зникає протягом 10 с. Останні декілька мл розчину треба доливати краплями, додаючи наступну краплю тільки тоді, коли зникає забарвлення, що з'явилося від попередньої краплі перманганату. Нормальність розчину перманганату калію обчислюють за формулою:

$$K = \frac{0,05 \times 25}{a},$$

де:

K – нормальність розчину перманганату калію;

a – об'єм розчинну перманганату калію, витрачений на титрування щавлевої кислоти, мл;

0,05 – нормальність приготованого розчину щавлевої кислоти;

25 – об'єм 0,05 N розчину щавлевої кислоти, взятий для титрування.

Із 0,05 N розчину шляхом розведення в день аналізу готують 0,01 N розчин перманганату калію.

Розчин перманганату калію можна також приготувати з фіксаналу.

Реактив № 5 (0,1 N розчин соляної кислоти). У мірчу колбу ємністю 1 л наливають приблизно 600 мл дистильованої води, вносять туди 8,5 мл соляної кислоти (HCl) густиною 1,19, ретельно перемішують, додають дистильовану воду до мітки та знову перемішують.

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАТЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Охарактеризуйте вміст щавлевої кислоти у рослинах. Які рослини містять найбільшу кількість щавлевої кислоти?

2. На чому базується принцип методу визначення щавлевої кислоти за Х. Н. Починком?

3. Охарактеризуйте перебіг виконання аналізу. Як визначити водорозчинні та нерозчинні сполуки щавлевої кислоти?

4. Як визначається концентрація титрованого розчину перманганату калію?

РОБОТА 12.9. ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ У РОСЛИНАХ БУРШТИНОВОЇ КИСЛОТИ (ЗА Х. Н. ПОЧИНКОМ)

Бурштинова кислота міститься в багатьох рослинах. У невеликих кількостях вона міститься в недозрілій вишні, агрусі, винограді, абрикосах, а також у смородині, вишні, яблуках. Кальцієві і барієві солі бурштинової кислоти набагато більш розчинні у воді, ніж солі інших органічних кислот.

Принцип методу. Із рослинного матеріалу бурштинової та інші органічні кислоти вилучають оцтовою кислотою у присутності ацетату барію. Певну частину витяжки упарюють на водяній бані. Осад промивають 70 % етанолом для видалення цукрів та інших розчинних сполук. Промитий осад, який містить барієві солі органічних кислот, розчиняють у воді і обробляють перманганатом калію. За цих умов усі кислоти, крім бурштинової, окислюються до вуглекислого газу і води. Осад діоксиду марганцю видаляється центрифугуванням, а розчин випаровується до висихання. Під час цього утворюється барієва сіль бурштинової кислоти, яку промивають 70 % етанолом від надлишку барію. Промитий бурштиновокислий барій розчиняють у соляній кислоті. Утворюється еквівалентна кількість іонів барію, які осаджуються біхроматом калію у присутності ацетату натрію. Осад хромату барію промивають водою, розчиняють у соляній кислоті, обробляють йодидом калію і вивільнений йод титрується тіосульфатом натрію.

Перебіг аналізу. Зважують 5 г свіжого подрібненого рослинного матеріалу, подрібнюють у ступці з 5 мл 1 % оцтової кислоти і 2 мл 20 % розчину ацетату барію. Розтерту масу переносять у центрифугальну пробірку, змиваючи залишок 1 % оцтовою кислотою у ту саму пробірку, перемішують скляною паличкою та центрифугують. Розчин переносять у мірчу колбу ємністю 50 мл, а залишок промивають 2 рази 1 % оцтовою кислотою порціями по 10–15 мл з настоюванням і ретельним перемішуванням протягом 5 хв. Центрифугат кожного разу додають до розчину в колбі, об'єм отриманого розчину доводять дистильованою водою до 50 мл, перемішують, відбирають піпеткою 25 мл, примішують у фарфорову чашку і випарюють на водяній бані до висихання. Залишок у чашці, в якій повинно бути від 2 до 18 мг бурштинової кислоти, промивають 2 рази 70 % етанолом порціями по 3–5 мл, переносять осад у центрифугальну пробірку і центрифугують. Розчин видалають, а осад у чашці і пробірці сушать від залишків спирту на водяній бані, попередньо розподіливши осад на стінках пробірки, щоб уник-

нути викидання осаду. Після висушування осад розчиняють у 8 мл дистильованою водою, додаючи її по 2 мл спочатку в чашку, після чого з чашки у пробірку.

До водного розчину у пробірці додають 2 мл 4 % розчину перманганату калію, розмішують та залишають на 40 хв. Після цього додають 1 мл 10 % розчину мурашиної кислоти, перемішують і залишають ще на 10 хв. Далі центрифугують та зливають розчин у фарфорову чашку, а осад промивають 1 раз 3 мл води. У чашку додають 2 мл 20 % розчину ацетату барію та 2 краплі 2 % розчину солянокислого гідроксиламіну для усунення окисних процесів. Розчин випарюють на водяній бані. Після охолодження осад переносять у центрифугальні пробірки за допомогою 4 мл 70 % етанолу, центрифугують і розчин видаляють, а осад промивають 2 рази 70 % етанолом порціями по 3 мл, енергійно струшуючи, і центрифугують з осадом. Для того, щоб перемішати щільний осад, необхідно додати 2 краплі етанолу та енергійно струсити до появи каламуті осаду, після цього додати залишок спирту та перемішати.

Осад сукцинату барію розчиняють у 3 мл 0,1 N розчину соляної кислоти, обробляючи спочатку чашку. Залишок кислоти змивають 2 мл дистильованої води, об'єднуючи з розчином у пробірці. Далі в розчин додають 1 мл 0,5 N розчину біхромату калію, 2 мл розчину 30 % ацетату натрію, перемішують та приміщують пробірку у склянку з гарячою водою. Воду у склянці попередньо нагрівають до кипіння і знімають із плитки. Пробірку залишають у гарячому розчині на 5 хв. Після цього пробірку виймають із гарячої води, розчин охолоджують і центрифугують.

Центрифугат зливають, а осад промивають 2 рази водою, додаючи її по 5 мл. Промитий осад BaCrO_4 розчиняють у 10 мл 1 N розчину соляної кислоти, переносять у колбу для титрування, змиваючи залишок розчину дистильованою водою. До розчину в колбі додають 1 мл 20 % розчину йодиду калію та йод, що утворився, титрують 0,01 N розчином тіосульфату натрію у присутності індикатора крохмалю. Вміст бурштинової кислоти обчислюють за формулою:

$$X = \frac{3,93 \times K \times a \times V}{n \times V_1},$$

де:

X – вміст бурштинової кислоти, %;

V – загальний об'єм досліджуваного розчину, мл;

V_1 – об'єм досліджуваного розчину, взятого для визначення бурштинової кислоти, мл;

a – об'єм розчину тіосульфату натрію, витраченого на титрування виділеного йоду, мл;

K – нормальність розчину тіосульфату натрію;

n – наважка досліджуваного матеріалу, г;

3,93 – нормальний титр бурштинової кислоти, помножений на 100 для перерахунку у відсотки.

Обладнання

1) фарфорові ступки з товчачиками; 2) аналітичні терези; 3) центрифугальні пробірки; 4) центрифуга; 5) мірчі колби ємністю 50 мл; 6) фарфорові випарувальні чашки; 7) термостійкі склянки; 8) конічні колби для титрування; 9) мірчі піпетки; 10) водяна баня.

Реактиви

1) оцтова кислота (CH_3COOH) 1 % розчин; 2) ацетат барію ($\text{Ba}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$) 20 % розчин; 3) етанол ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) 70 % розчин; 4) перманганат калію (KMnO_4) 4 % розчин; 5) мурашина кислота (HCOOH) 10 % розчин; 6) солянокислий гідроксиламін ($\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$) 2 % розчин; 7) соляна кислота (HCl) 0,1 N розчин; 8) біхромат калію ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) 0,5 N розчин; 9) ацетат натрію (CH_3COONa) 30 % розчин; 10) йодид калію (KI) 20 % розчин; 11) тіосульфат натрію ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 0,01 N розчин.

Приготування реактивів

Реактив № 2 (20 % розчин ацетату барію). Зважують 100 г солі $\text{Ba}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ х. ч., розчиняють у воді та доводять об'єм розчину до 500 мл. За відсутності цієї солі її можна приготувати з гідроксиду барію та оцтової кислоти. Для цього зважують 124 г $\text{Ba}(\text{OH})_2\cdot 8\text{H}_2\text{O}$, переносять у склянку, додають 350 мл дистильованої води, 47 мл концентрованої оцтової кислоти та нагрівають за умови помішування до розчинення. Розчин фільтрують через паперовий фільтр, збираючи фільтрат у мірчу колбу ємністю 500 мл. Об'єм розчину доводять до 500 мл та перемішують.

Реактив № 3 (70 % розчин етанолу). До 100 мл 95 % етанолу ($\text{C}_2\text{H}_5\text{J}_5$) додають 39 мл дистильованої води та ретельно перемішують.

Реактив № 4 (4 % розчин перманганату калію). Зважують 4 г KMnO_4 та розчиняють у 100 мл дистильованої гарячої води.

Реактив № 5 (10 % розчин мурашиної кислоти). 41 мл мурашиної кислоти густиною 1,22 розчиняють у воді та доводять об'єм розчину дистильованою водою до 500 мл.

Реактив № 6 (2 % розчин солянокислого гідроксиламіну). Зважують 2 г $\text{NH}_2\text{OH HCl}$ ч. д. а., розчиняють у дистильованій воді та доводять об'єм розчину дистильованою водою до 100 мл.

Реактив № 7 (0,1 N розчин соляної кислоти). Готують 0,1 N розчин соляної кислоти, для чого 84 мл HCl густиною 1,19 розчиняють у воді та доводять об'єм дистильованою водою до 1 л. Для отримання 0,01 N розчину цей розчин розводять дистильованою водою у 10 разів.

Реактив № 8 (0,5 N розчин біхромату калію). 24,51 г $K_2Cr_2O_7$ розчиняють у дистильованій воді, доводять об'єм розчину дистильованою водою до 1 л та ретельно перемішують.

Реактив № 9 (30 % розчин ацетату натрію). Зважують 30 г ацетату натрію ($CH_3COONa \cdot 3H_2O$) ч. д. а., розтирають у ступці з 10 мг HgI_2 , розчиняють у дистильованій воді, доводять об'єм до 100 мл та фільтрують.

Реактив № 10 (20 % розчин йодиду калію). Зважують 20 г KI ч. д. а., розчиняють у воді, додають 1 мл 2 N розчину гідроксиду натрію, доводять об'єм розчину дистильованою водою до 100 мл та зберігають у темній пляшці.

Реактив № 11 (0,1 N титрований розчин тіосульфату натрію). Зважують 25 г тіосульфату натрію $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$, розчиняють у дистильованій воді, у якій попередньо розчиняють 0,2 г Na_2CO_3 , далі об'єм доводять до 1 л водою, ретельно перемішують та установлюють нормальність за біхроматом калію. Для цього готують 0,1 N розчин біхромату калію – зважують 4,9035 г $K_2Cr_2O_7$ х. ч., розчиняють у воді, переносять у мірчу колбу об'ємом 1 л, доводять водою до мітки та ретельно перемішують. Набирають піпеткою 25 мл цього розчину у колбу для титрування, додають 5 мл 20 % розчину йодиду калію, 10 мл сірчаної кислоти (1 : 9) та титрують тіосульфатом натрію у присутності 1 мл 0,5 % розчину крохмалю. Нормальність розчину тіосульфату натрію обчислюють за формулою:

$$K = \frac{25 \times 0,1}{a},$$

де:

K – нормальність титрованого розчину тіосульфату;

a – об'єм тіосульфату, який витрачений на титрування 25 мл 0,1 N розчину біхромату калію.

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Наведіть характеристику будови молекули бурштинової кислоти. Охарактеризуйте її класифікацію.
2. У яких процесах рослинної клітини бере участь бурштинова кислота? Яке її значення у життєдіяльності рослин?
3. Охарактеризуйте принцип методу визначення бурштинової кислоти за методикою Х. Н. Починка.
4. Наведіть послідовність проведення аналізу вмісту бурштинової кислоти у рослинному матеріалі.
5. Як встановлюють титр розчину тіосульфату натрію, який використовується у роботі?

РОБОТА 12.10. ЯКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ОРГАНІЧНИХ КИСЛОТ ХРОМАТОГРАФІЄЮ НА ПАПЕРІ

Якщо необхідно визначити тільки наявність певних органічних кислот у зразках рослин, зручно використовувати швидкий метод їх ідентифікації хроматографією на папері, який запропонував О. І. Єрмаков.

Принцип методу. Вільні кислоти вилучаються сумішшю ефіру та ацетону, а сума вільних і зв'язаних кислот – тією самою сумішшю з додаванням сірчаної кислоти. Органічні кислоти розділяються висхідною хроматографією на папері, а їх якісний склад визначається шляхом порівняння розташування плям на хроматограмах із дослідного рослинного екстракту з розташуванням плям відомих органічних кислот (свідків).

Перебіг аналізу. Для екстракції вільних органічних кислот у конічну колбу ємністю 50 мл примішують добре подрібнений сухий рослинний матеріал (1–5 г, залежно від передбачуваного вмісту кислоти), додають 10–15 мл суміші сірчаного ефіру і ацетону (2,5 : 7,5), щільно закривають пробкою і струшують на струшувальному апараті протягом 30 хв. Для визначення вільних та зв'язаних із катіонами кислот на кожні 10 мл суміші ефіру та ацетону додають кілька крапель 20 % сірчаної кислоти. Під дією кислоти руйнуються солі і звільнені органічні кислоти переходять у розчин.

Після екстракції вміст колби фільтрують, переносять у фарфорову чашку і випарюють розчинник до висихання на водяній бані. Сухий залишок у чашці розчиняють в 1 мл дистильованої води, акуратно перемішуючи її вміст скляною паличкою. Отриманий розчин, у якому містяться органічні кислоти, переносять на невелику пробірку, закривають пробкою та використовують для хроматографічного визначення.

Для розділення органічних кислот використовується висхідна хроматографія на папері. Для цього використовують камеру зі скла або пластику, всередині якої є скляна підставка для фіксації паперу (рис. 46). У нижній частині камери ставлять кювету з розчинником. Верхню частину камери щільно закривають кришкою, у яку вставляють затвор Бунзена. Для виготовлення затвору Бунзена на скляну трубку

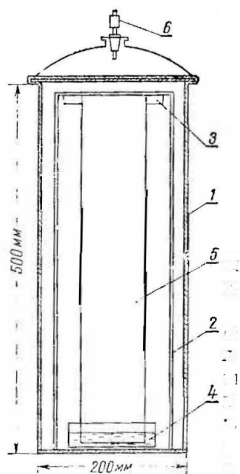


Рис. 46. Хроматографічна камера для висхідної хроматографії на папері:

- 1 – стінки камери;
- 2 – підставка (скляна або пластикова);
- 3 – тримач паперу;
- 4 – чашка з розчинником;
- 5 – хроматографічний папір;
- 6 – затвор Бунзена

діаметром 1–2 см надягають гумову трубку довжиною кілька сантиметрів, на якій поздовжньо роблять надріз довжиною 0,5–1 см. На іншому кінці трубки вставляють короткий відрізок скляної палички. Затвор необхідний для усунення у хроматографічній камері надлишкового тиску від парів летючих розчинників.

Для хроматографічного розділення органічних кислот використовують «повільний» папір. На смужку паперу довжиною 40–45 см шириною приблизно 15 см на відстані 4–5 см від кінця полоси та 5–7 см від краю паперу наносять мікропіпеткою одну краплю водного розчину органічних кислот і висушують. Далі у цю саму точку наносять ще краплю екстракту і знову висушують. Загальний об'єм нанесеного екстракту повинен становити 0,005 мл. Крім експериментального розчину, наносять краплі розчинів кислот-свідків, які наносять на ту саму смужку паперу на відстані 4–5 см від кінця смужки. Відстані між окремими точками кислот, а також експериментальним розчином, повинні бути не менше 1,5 см. Набір органічних кислот-свідків готують у концентрації 5 %, розчиняючи їх у 50 % спирті; фумарову і винну кислоти готують у концентрації 2 %, а аконітову – у концентрації 0,5 %. На хроматограму кожену кислоту-свідок наносять по одній краплі окремо, а також суміш усіх кислот в одну точку. Для приготування суміші змішують по 0,2 мл всі розчини окремих свідків та наносять на папір як свідок.

Після цього приступають до хроматографії. Як рухлива фаза для хроматографії використовується суміш *n*-бутанолу, мурашиної кислоти та води. Для приготування суміші беруть 250 мл *n*-бутанолу, 25 мл мурашиної кислоти і 297 мл води. Утворену суміш переносять у пляшку з пробкою, струшують кілька годин і дають відстоятися протягом доби. Суміш за цей час поділяється на два шари. Верхній шар – *n*-бутанол, насичений мурашиною кислотою. Нижній шар – це водний розчин мурашиної кислоти, який насичується бутанолом. Верхній шар використовується як розчинник для хроматографії.

Під час хроматографії смужку хроматографічного паперу з нанесеними розчинами органічних кислот підвішують у камері так, щоб нижній кінець хроматограми занурився у кювету з розчинником. Розчинник наливають у кювету в такій кількості, щоб його поверхня була приблизно на 2–3 см нижче за плями з нанесеними розчинами кислот. Одночасно в камеру підвішують смужку фільтрувального паперу розміром 30 × 5 см, попередньо змочену розчином мурашиної кислоти, насиченої *n*-бутанолом. Це необхідно для заповнення камери парами бутанолу. Після цього камеру щільно накривають кришкою.

Хроматографія проводиться у прохолодному приміщенні за температури 12–16 °С. Розділення кислот продовжується протягом 18–24 год і закінчується тоді, коли фронт розчинника піднімається приблизно на 3/4–4/5 довжини смужки паперу. Після цього хроматограми виймають із камери, відмічають олівцем

границю проходження фронту розчинника та висушують хроматограму у витяжній шафі.

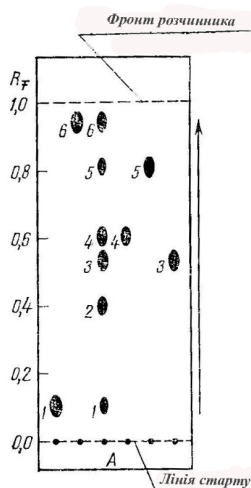


Рис. 47. Схема висхідної хроматограми органічних кислот на папері:
1 – щавлева кислота;
2 – винна кислота;
3 – лимонна кислота;
4 – яблучна кислота;
5 – піровиноградна кислота;
6 – фумарова кислота.
А – суміш органічних кислот

Для ідентифікації органічних кислот як проявник найчастіше використовують розчин бромфенолового синього з рН 6,7. Хроматограму обробляють цим розчином із пульверизатора. Органічні кислоти забарвлюються у яскраво-жовтий колір на блакитно-синьому тлі.

Замість бромфенолового синього можна взяти інші проявники. Наприклад, часто використовуються розчин, до складу якого входять 2 г глюкози, 2 мл аніліну, 20 мл води, 20 мл етанолу та 60 мл п-бутанолу. Після обприскування хроматограму сушать протягом 10 хвилин у сушильній шафі за 115 °С. Після висушування хроматограми виймають із сушильної шафи. На хроматограмах плями органічних кислот проявляються у вигляді темно-коричневих плям на білому тлі.

Ідентифікація органічних кислот здійснюється відповідно до значень їх коефіцієнтів рухомості (**Rf**), які залежать від типу паперу, використаного розчинника, температури. За наведених вище умов хроматографування величини **Rf** деяких органічних кислот наведені у табл. 9 (рис. 47). Слід зазначити, що перед початком визначення органічних кислот у різних рослинних об'єктах необхідно ви-

значити їх значення **Rf** у цих умовах проведення хроматографії.

Таблиця 9. Значення **Rf** деяких органічних кислот

Кислота	Rf	Кислота	Rf
Щавлева	0,09	Молочна	0,83
Винна	0,41	Піровиноградна	0,84
Лимонна	0,54	Бурштинова	0,89
Яблучна	0,64	Фумарова	0,92
Малеїнова	0,78		

Обладнання

1) хроматографічні камери; 2) хроматографічний папір; 3) пульверизатор; 4) мікропіпетки; 5) конічні колби; 6) мірчі колби ємністю 100 мл; 7) ділильна лійка; 8) фарфорові чашки; 9) хроматографічні камери; 10) лійки; 11) фільтри.

Реактиви

1) етанол; 2) діетиловий ефір; 3) ацетон; 4) n-пропанол; 5) мурашина кислота; 6) сірчана кислота (H_2SO_4) 20 % розчин; 7) гідроксид натрію (NaOH) 0,1 N розчин; 8) бромфеноловий синій; 9) глюкоза; 10) анілін; 11) набір органічних кислот.

Приготування реактивів

Реактив № 8 (бромфеноловий синій (проявник)). Для приготування реактиву зважують 40 мг індикатору бромфенолового синього та розчиняють його у 50 мл 95 % етанолу. У розчин додають краплями 0,1 N розчин гідроксиду натрію (NaOH) до появи синьо-фіолетового забарвлення, після чого об'єм розчину доводять етанолом до 100 мл.

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАНЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Дайте характеристику хроматографічного методу розділення речовин.
2. Які умови впливають на розділення речовин хроматографічним методом?
3. Наведіть етапи якісного аналізу органічних кислот. Які речовини називають свідками і для чого вони застосовуються?
4. Як проводиться ідентифікація органічних кислот після хроматографії? Які проявники застосовують для проявлення хроматограм?

РОБОТА 12.11. КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ОРГАНІЧНИХ КИСЛОТ ІЗ ВИКОРИСТАННЯМ ІОНООБМІННИКІВ ТА ХРОМАТОГРАФІЇ НА ПАПЕРІ

У рослинах можуть одночасно міститися 5–6 і більше органічних кислот у значній кількості. Їх розділення звичайними хімічними методами вимагає багато часу. Методи, основані на використанні іонообмінних смол і хроматографії на папері, швидші.

Принцип методу. Кислоти вилучають із рослинного матеріалу водою, екстракт очищають, пропускаючи його через іонообмінник. Далі відокремлюють ді- та трикарбонові кислоти титруванням екстракту $\text{Ba}(\text{OH})_2$ і додаванням спирту. Солі барію полікарбонових кислот погано розчиняються в 60–75 % етанолі і залишаються у осаді, а відповідні солі монокарбонових кислот (наприклад, молочної та піровиноградної), що утворюється під час первинного окислення цукрів, залишаються в розчині. Спирт видаляють, осад розчиняють у воді, пропускають через катіоніт і здійснюють якісне або кількісне визначення кислот за допомогою хроматографії на папері.

Перебіг аналізу. Якщо для аналізу використовують висушений рослинний матеріал, його ретельно розтирають у ступці і просівають через сито. Зважують наважку 3–10 г та переносять у широкогорлу колбу ємністю 200 мл. За умови

використання свіжого рослинного матеріалу наважка повинна становити 10–50 г. У цьому разі наважку подрібнюють у ступці або гомогенізаторі, кількісно переносять у широкогорлу колбу ємністю 200 мл та екстрагують кислоти водою. Для цього в колбу наливають 150 мл гарячої води, ставлять її на водяну баню і нагрівають за умови періодичного збовтування протягом 1–2 год за температури 60 °С.

Після завершення екстракції вміст колби охолоджують, об'єм екстракту доводять водою до 200 мл, ретельно перемішують і фільтрують у суху колбу. Слід мати на увазі, що водні екстракти зі свіжих рослинних тканин часто фільтруються дуже повільно, тому їх фільтрують на лійці Бюхнера у колбу Бунзена під вакуумом або центрифугують. Далі беруть 100 мл екстракту і для видалення солей, амінокислот та деяких інших речовин пропускають через катіонообмінник. Розчин пропускають спочатку через катіоніт, внаслідок чого з водного або спиртового екстракту з рослинного матеріалу в розчин переходять кислоти і неелектроліти, в основному цукри, які іноді потрібно видалити з розчину. У таких випадках після катіоніту розчин пропускають через аніоніт. Аніоніт адсорбує кислоти, а цукри залишаються в розчині. Адсорбовані кислоти елюють з іоннообміннику. Для аналітичної роботи з органічними кислотами рослин використовується хроматографічна колонка, схема якої представлена на рис. 48. Ця колонка вміщує приблизно 15 г іонообмінника. Оптимальний розмір частинок іонообмінника – 0,1–0,3 мм, менші частинки ускладнюють переміщення розчинів через колону. Для підготовки колони іонообмінну смолу подрібнюють у ступці і просівають через сито для отримання частинок необхідного розміру. Далі приблизно 20 г іонообмінника (для кожного стовпа) переносять у конічну колбу ємністю 0,5 л, доливають 200–250 мл води і ставлять на 3 години для набухання, часто струшуючи. Набухлий катіонообмінник багаторазово промивають дистильованою водою до повного знебарвлення промивної води. Після цього заповнюють колонку катіонітом, для чого на дно колонки примішують невеликий шматок скляної вовни і катіонообмінник переводять невеликими порціями у колонку разом із водою, трамбуєючи кожну порцію скляною паличкою. Для перенесення катіонообмінника у форму H^+ через колонку пропускають 7 % розчин соляної кислоти з розрахунку 1,5–2,5 мл на хвилину. Швидкість потоку кислоти через катіоніт регулюється краном. Для переводу у H^+ форму 15 г катіоніту потрібно 150 мл соляної кислоти. Після заповнення колонки та переведення у H^+ форму катіоніт у колонці промивають дистильованою водою до повного

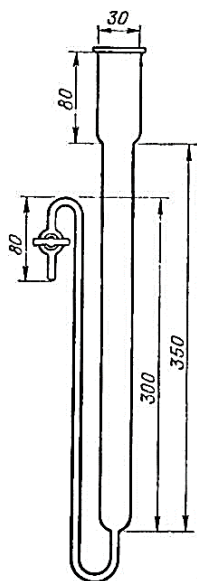


Рис. 48. Колонка для розділення органічних кислот

зникнення реакції на HCl у фільтраті. Після використання приблизно 75 % загальної ємності катіоніту проводиться нове переведення у H^+ форму. Обмінна ємність катіонітів становить приблизно 5 мг еквівалентів на 1 г.

Аніоніт готують для роботи так само, як і катіоніт. Для його переведення в активний стан використовують 4 % розчин гідроксиду натрію, який пропускають через колонку до тих пір, поки концентрація NaOH у рідині, що витікає з колонки, не складе 4 %. Зазвичай для цього повинно пройти через колонку приблизно 200 мл розчину NaOH. Після активації аніоніту надлишок луку з колонки видаляють, промиваючи його водою до тих пір, поки у промивній воді не зникне рожеве забарвлення від додавання фенолфталеїну. Швидкість протікання всіх розчинів через колонку повинна бути 1,5–2,5 мл/хв. Аніоніт адсорбує кислоти, які вилучають після сорбції 0,2 N розчином сірчаної кислоти.

Для виділення органічних кислот та розділення їх барієвих солей 100 мл отриманого фільтрату пропускають через колонку з катіонітом. Після цього колонку тричі промивають водою порціями по 75–80 мл. Після проходження через колонку екстракт і всі промивні води переносять у колбу ємністю 500–600 мл, додають декілька крапель 1 % спиртового розчину фенолфталеїну і титрують розчином 0,1 N $Ba(OH)_2$ до появи рожевого забарвлення. Під час нейтралізації розчину баритом визначається загальна кількість кислот, а кислоти діляться на групи за різною розчинністю їх солей барію у спиртових розчинах.

Загальна кількість кислот у міліеквівалентах на 1 г рослинного матеріалу розраховується так: 1 мл точно 0,1 N розчину $Ba(OH)_2$ відповідає 0,1 міліеквіваленту кислот. Для аналізу було взято 100 мл екстракту, що відповідає половині наважки, яку було екстраговано 200 мл води. Тому формула розрахунків буде така:

$$X = \frac{a \times T \times 10}{n \times 0,5},$$

де:

X – вміст органічних кислот, мг-екв/г;

a – об'єм 0,1 N розчину $Ba(OH)_2$, витраченого на титрування, мл;

T – титр розчину $Ba(OH)_2$;

10 – коефіцієнт перерахунку в мг-екв;

n – наважка рослинного матеріалу, г;

$0,5$ – відношення взятого для визначення екстракту до його загального об'єму.

Після нейтралізації баритом у розчині залишаються барієві солі органічних кислот, а незначний осад барієвих солей сірчаної, фосфорної і деяких інших кислот відфільтровують. Фільтр промивають декількома порціями теплої води. Фільтрат та промивні води об'єднують та кількісно переносять у велику склянку, ставлять у водяну баню та упарюють до 50–70 мл. Далі рідину переносять у

фарфорову чашку (склянку необхідно ретельно промити і злити в чашку миючу воду) та випаровують на водяній бані до об'єму 20–25 мл. Після цього рідину з фарфорової чашки переносять у мірчий циліндр об'ємом 100 мл. Чашку промивають декількома порціями теплої води і доводять об'єм рідини в циліндрі до 37 мл. Далі в циліндр додають 96 % етанол до об'єму 100 мл. Так отримують 60 % спиртовий розчин. Рідину в циліндрі акуратно перемішують довгою скляною паличкою. Якщо на нейтралізацію органічних кислот витрачено більше 100 мл 0,1 N розчину $\text{Ba}(\text{OH})_2$, тобто рослинний екстракт містив підвищену кількість кислот, беруть циліндр об'ємом 200 мл. Барієві солі ді- і трикарбонових кислот осаджуються 60 % етанолом, а солі летючих кислот залишаються в розчині. Циліндр з екстрактом та осадом залишають на 12–18 год для повного осадження барієвих солей.

Наступного дня проводиться фільтрація. Для цього береться скляний фільтр, висушений до постійної ваги, всередину якого вставляється диск із товстого фільтрувального паперу. Фільтр закріплюють у колбі Бунзена і розчин фільтрують під вакуумом. Осад переносять на фільтр невеликими порціями 60 % етанолу. Осад на фільтрі тричі промивають невеликими порціями 60 % етанолу. Фільтр із осадом сушать у термостаті і визначають вагу осаду, за якою можна приблизно визначити загальний вміст органічних кислот. Оскільки вміст барію у більшості барієвих солей ді- та трикарбонових кислот становить 48–55 % (у середньому 52 %) можна достатньо точно розрахувати їх кількість у аналізованому рослинному матеріалі.

Осад розчиняють у воді (якщо осад погано розчиняється, його нагрівають). Розчин після охолодження пропускають через колону, наповнену катіонітом зі швидкістю приблизно 2 мл за 1 хв. Далі катіоніт промивають 200 мл води. Рідину збирають у велику склянку і випаровують на водяній бані до невеликого об'єму. Надосадовий розчин кількісно переносять у мірчу колбу і доводять його об'єм дистильованою водою до мітки. Об'єм колби вибирають так, щоб концентрація кислоти в розчині становила 4–6 %. Отриманий розчин використовують для хроматографічних визначень.

Перш ніж приступити до хроматографії, визначають точну кількість суми органічних кислот у розчині шляхом титрування лугом.

Для кількісної хроматографії органічних кислот беруть хроматографічні камери, які зазвичай використовуються для розділення. На дні такої камери розміщують кювету, в яку наливають розчинник, а хроматограми підвішують у верхній частині камери так, що нижній кінець хроматографічного паперу занурюється у розчинник на 1–1,5 см. Використовують хроматографічний папір марки «повільний». Розмір хроматографічного паперу 52 × 64 см. За довжиною його розрізають на дві смужки шириною 26 см і, відступаючи 2,5 см від вузького

краю смуги, олівцем накреслюють лінію. На всю цю лінію мікропіпеткою наносять розчин кислот. Ширину смуги не повинна перевищувати 5 мм. Розчин наносять у кілька етапів, просушуючи папір вентилятором або феном. Всього на одну хроматограму слід нанести 15–20 мг кислот. Якщо досліджуваний розчин мав концентрацію 4–6 %, то необхідно нанести 0,4–0,5 мл цього розчину.

Для хроматографії органічних кислот використовуються дві системи розчинника: бутанол – мурашина кислота – вода (18 : 2 : 9) і ефір – вода – мурашина кислота (18 : 9 : 5). Для приготування першого розчинника скляну посудину об'ємом 1,5–2 л наливають 450 мл n-бутанолу, 50 мл мурашиної кислоти та 225 мл води. Другий розчинник готують шляхом змішування 450 мл діетилового ефіру, 225 мл води та 125 мл мурашиної кислоти. Під час вибору розчинника для хроматографії необхідно враховувати, що якщо як розчинник використовується суміш бутанолу, мурашиної кислоти і води, то в такій суміші лимонна і яблучна кислоти не відокремлюються, оскільки вони мають дуже близькі значення *R_f*. Тому цей розчинник можна використовувати, якщо в дослідному матеріалі одна з цих кислот відсутня або нема необхідності розділяти і кількісно оцінювати вміст яблучної або лимонної кислоти. В інших випадках використовують суміш ефіру, води і мурашиної кислоти у співвідношенні 18 : 9 : 5. На розділення суміші кислот сильно впливає температура, найкращі результати отримують за 12–14 °С. Експерименти показали, що відстані між зонами лимонної і яблучної кислот на хроматограмах, зроблених за цієї температури, становлять 15–20 мм, за 20 °С – 5–10 мм, а за 24 °С яблучна і лимонна кислоти не розділяються.

Для хорошого поділу всіх органічних кислот краще провести хроматографію з використанням обох розчинників: один аркуш паперу з нанесеними органічними кислотами хроматографують у першій суміші, а інший аркуш в іншій хроматографічній камері – у другій.

Після висихання аркуш хроматографічного паперу з нанесеними на нього кислотами в камері підвішують, на дно її наливають розчинник, щільно закривають камеру та проводять хроматографію. Для кращого розділення кислот хроматографування проводять протягом 48–50 год (у два кроки). Перший раз хроматограму витримують у камері 24 год. Далі її розвішують у витяжній шафі та висушують з допомогою фена або вентилятора протягом 20–30 хв, щоб видалити ефір. Після цього хроматограму знову приміщують у камеру і розчинник пропускають ще 24 год. Після закінчення хроматографії папір сушать у витяжній шафі та залишають на ніч. Наступного дня хроматографію сушать за температури 60–80 °С протягом 2–3 год для видалення слідів мурашиної кислоти. Після висихання хроматограму приміщують на чисте скло та визначають зони розташування кислот. Для цього по довжині хроматограми, відступаючи на 10 мм від країв, наносять мікропіпеткою вузькою смужкою проявник (0,05 % спиртовий

розчин бромфенолового синього). У зонах розташування органічних кислот проявник забарвлюється у жовтий колір, а у проміжках між ними залишається синім. Якщо мурашина кислота не буде повністю видалена, смужка проявника стане жовтою по всій довжині. У цьому випадку необхідно провести видалення мурашиної кислоти шляхом додаткового висушування хроматограми за температури 60–80 °С. Зони розташування кислот на хроматограмі відмічають олівцем.

Ідентифікація кислот здійснюється насамперед порівнянням отриманої хроматограми з якісною хроматограмою, на яку наносять суміш свідків. Можна застосовувати ширший аркуш хроматографічного паперу, на який наносять дослідні кислоти та кислоти-свідки. Однак з урахуванням того, що органічні кислоти мають досить близькі *R_f*, їх співпадіння на дослідних та контрольних хроматограмах ще не є повною гарантією їх тотожності. Тому під час роботи з новими зразками рослинного матеріалу, для якого невідомий склад органічних кислот, необхідно, крім свідків, використовувати специфічні кольорові реакції для виявлення кислот.

Після визначення зон розташування індивідуальних кислот їх вирізають із хроматограми, нарізають вузькими короткими смужками, переносять у невеликі колби і тричі екстрагують водою (по 15 мл кожного разу). Під час екстракції вміст колби обережно нагрівають до кипіння і теплий розчин зливають у мірчу колбу об'ємом 50 мл. Після третьої екстракції вміст колби охолоджують, доводять до позначки водою і перемішують. Таку екстракцію проводять для кожної смужки індивідуальної кислоти окремо. З отриманих розчинів беруть по 25 мл, переносять у конічні колби, додають по 3 краплі спиртового розчину фенолфталеїну та титрують із мікробюретки 0,02 N розчином NaOH до рожевого забарвлення.

Під час обчислення результатів враховують, що співвідношення кислот у досліджуваному розчині, використовуваному для хроматографування, не змінюється, тому кількість мілілітрів 0,02 N розчину лугу, спожитого на титрування кислот, підсумовується і далі розраховується у відсотках частка лугу для кожної кислоти. За обчисленим відсотковим вмістом розподіляють весь об'єм лугу, витрачений на нейтралізацію кислот, бар'єві солі яких були осаджені 60 % етанолом.

Об'єм лугу, розрахований для кожної кислоти, множать на відповідний коефіцієнт для перерахунку об'єму лугу у міліграми кислоти. Для 0,02 N розчину лугу коефіцієнти перерахунку такі: для винної кислоти 1,50; яблучної – 1,34; лимонної – 1,28; бурштинової – 1,18; фумарової – 1,16; щавлевої – 0,94. Значення, отримані для кожної кислоти, перераховують на вагу матеріалу і виражаються у відсотках.

Обладнання

1) хроматографічні камери; 2) сушильна шафа; 3) вентилятор; 4) хроматографічні колонки; 5) водяна баня; 6) гомогенізатор; 7) центрифуга; 8) скляні плас-

тини; 9) мікропіпетки; 10) мікробюретка; 11) фарфорові чашки; 12) мірні колби ємністю 200, 100, 50 і 25 мл; 13) склянки ємністю 1 л, 200 та 100 мл; 14) конічні колби ємністю 600, 100, 50 мл; 15) скляний фільтр; 16) хроматографічний папір; 17) катіоніт.

Реактиви

1) гідроксид барію ($\text{Ba}(\text{OH})_2$) 0,1 N розчин; 2) гідроксид натрію (NaOH) 0,1 та 0,02 N розчин; 3) етанол ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) 96 % і 60 % розчин; 4) фенолфталеїн 1 % спиртовий розчин; 5) бромфеноловий синій 0,05 % спиртовий розчин; 8) п-бутанол; 6) мурашина кислота; 7) етиловий ефір; 8) соляна кислота (HCl) концентрована; 9) набір органічних кислот.

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАЇВ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Дайте характеристику принципу методу розділення органічних кислот.
2. Як проводиться очистка органічних кислот від домішок? Як готуються катіоніт та аніоніт для роботи?
3. Як проводиться хроматографія органічних кислот? Як на розділення органічних кислот впливають розчинники?
4. Як умови зовнішнього середовища (температура, насичення камери парами розчинника, концентрація кислот у екстракті) впливають на якість розділення органічних кислот?
5. Як обчислюється вміст суми органічних кислот та вміст окремих органічних кислот у досліджуваному рослинному матеріалі?

РОБОТА 12.12. ВИЗНАЧЕННЯ ДІ- І ТРИКАРБОНОВИХ КИСЛОТ ЗА ДОПОМОГОЮ ХРОМАТОГРАФІЇ НА ПАПЕРІ (ЗА Х. Н. ПОЧИНКОМ)

Принцип методу. Органічні кислоти, крім щавлевої кислоти, вилучають із рослинного матеріалу розчином оцтової кислоти, відокремлюють центрифугуванням, і отриманий розчин доводять водою до певного об'єму. Частину розчину використовують для визначення суми органічних кислот за допомогою окислення біхроматом калію та йодометричного титрування. Інша частина розчину використовується для визначення окремих кислот після їх хроматографічного розділення. Для цього розчин випарюють з ацетатом барію досуха, за цих умов органічні кислоти утворюють середні солі з барієвими іонами, нерозчинні у 70 % етанолі. Отримані чисті барієві солі органічних кислот розкладаються еквівалентною кількістю сірчаної кислоти.

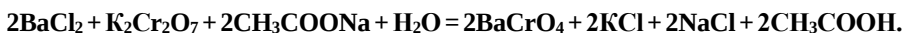
Отриманий осад сульфату барію відокремлюють центрифугуванням, а розчин, що містить вільні органічні кислоти, випаровується на водяній бані. Залишок розчиняється у такій кількості води, щоб отримати 4 % розчину кислот у перерахунку на яблучну кислоту. Після проведення хроматографії органічні кис-

лоти вилучають водою, підкисленою оцтовою кислотою. У розчинах після випаровування з ацетатом барію кислоти визначаються біхроматно-йодометричним методом. Щавлева кислота, яка утворює солі кальцію, не враховується цим методом. Хроматографування пов'язано зі значними втратами, тому її визначення здійснюється хімічним методом.

Перебіг аналізу. Зважують таку кількість матеріалу, щоб у ньому містилось від 50 до 100 мг суми органічних кислот (сухий рослинний матеріал від 0,4 до 1,5 г, сирий – від 2 до 6 г). Наважку розтирають у ступці з 10 мл 1 % розчину оцтової кислоти і отриману масу переносять у центрифугальну пробірку, змиваючи залишок у ступці 1 % оцтовою кислотою. Масу центрифугують і розчин заливають у мірчу колбу об'ємом 50 мл. До залишку додають 10 мл 1 % оцтової кислоти, перемішують, настоюють за умови перемішування протягом 5 хв та центрифугують. Розчин зливають у мірчу колбу, а решту промивають ще 2 рази, додаючи до залишку 10 мл 1 % оцтової кислоти. Об'єм витяжки доводять дистильованою водою до 50 мл та перемішують.

Визначення суми органічних кислот

З отриманого розчину кислот піпеткою збирають 5 мл, переносять у фарфорову чашку, додають 0,3 мл 20 % розчину ацетату барію і випаровують розчин на водяній бані до висихання. Сухий залишок промивають 70 % етанолом. Для цього у чашку додають 2 мл 70 % етанолу, вміст перемішують паличкою і отриману суспензію зливають у центрифугальну пробірку, змиваючи залишок 70 % етанолом 2 рази порціями по 2 мл. Далі пробірку зі вмістом струшують 2 хв та центрифугують. Прозорий розчин видаляють, переливаючи його у пляшку з відпрацьованим спиртом, а осад ще 2 рази промивають 70 % етанолом, додаючи по 3 мл і попередньо промиваючи чашку. До промитого осаду додають 10 мл 2 N розчину азотної кислоти, перемішують, занурюють у окуп на 3 хв, центрифугують і розчин заливають у фарфорову чашку. До залишку у пробірці додають 2 мл азотної кислоти і 10 мл дистильованої води, перемішують і центрифугують. Розчин зливають у фарфорову чашку, об'єднуючи з першою порцією, додають 1 мл 42 % хлорної кислоти і розчин випаровують на водяній бані до невеликого об'єму (приблизно 1 мл). Далі чашку приміщують на повітряну баню і випаровують до суха, поки не видалиться хлорна кислота. Після охолодження до залишку у чашці додають 2 мл азотної кислоти (1 : 1), змочуючи стінки, приміщують на киплячу водяну баню та випаровують до висихання. Залишок розчиняють у 5 мл 0,1 N соляної кислоти, переносять у центрифугальну пробірку, змиваючи залишок 2 мл дистильованої води. До отриманого розчину додають 1 мл 0,5 N розчину біхромату калію, 2 мл 30 % розчину ацетату натрію і перемішують. Під час реакції барій осаджується у формі хромату барію:



Пробірку з реакційною сумішшю примішують у склянку з гарячою водою на 3–5 хв для збільшення осаду. Потім пробірку знімають із гарячою водою, дають постояти 10–15 хв, центрифугують, розчин зливають, а осад промивають водою 2 рази порціями по 5 мл. Осад BaCrO_4 розчиняють у 10 мл 1 N розчину соляної кислоти, переносять у колбу для титрування ємністю 100 мл, змиваючи решту розчину дистильованою водою. До розчину у колбі додають 1 мл 20 % розчину йодистого калію. Під час цього утворюється йод, який титрують 0,01 N розчином тіосульфату натрію у присутності крохмалю до зникнення синього забарвлення.

Результат титрування використовують для розрахунку кількості 0,2 N розчину сірчаної кислоти, необхідного для розкладання солей барію органічних кислот, а також кількості води для розчинення органічних кислот. Розрахунки проводять за формулою:

$$X = \frac{4,47 \times V \times K \times a}{V_1 \times n},$$

де:

X – вміст суми кислот, % яблучної кислоти;

V – загальний об'єм екстракту, мл;

V_1 – об'єм екстракту, взятого для визначення кількості кислот, мл;

a – об'єм 0,01 N розчину тіосульфату натрію, витраченого на титрування, мл;

K – нормальність розчину тіосульфату натрію;

n – наважка досліджуваного рослинного матеріалу, г;

4,47 – нормальний титр яблучної кислоти, помножений на 100.

Приготування 4 % розчину вільних органічних кислот

Із залишків дослідного розчину беруть 40 мл, переносять у фарфорову чашку діаметром 8 см, додають 2 мл 20 % розчину ацетату барію і випарюють розчин на киплячій водянній бані. Сухий залишок промивають 70 % етанолом, щоб видалити цукри та інші розчинні домішки. Для цього у чашку додають 0,5 мл дистильованої води, перемішують скляною паличкою до однорідної маси, додають 5 мл 70 % етанолу, знову перемішують та переносять розчин з осадом у центрифугальну пробірку. Залишок змивають у пробірку 70 % етанолом 2 рази порціями по 5 мл, далі розчин з осадом перемішують протягом 5 хв скляною паличкою та центрифугують. Розчин зливають у пробірку, а осад промивають ще 2 рази 70 % етанолом порціями по 5 мл, спочатку промиваючи чашку. Під час промивання вміст пробірки ретельно перемішують скляною паличкою протягом 3 хв. Паличку промивають від дрібних частини осаду декількома краплями 70 % етанолу. Промивну рідину відокремлюють від осаду центрифугуванням. До промитого осаду доливають 10 мл 1 % розчину оцтової кислоти, перемішують скляною паличкою декілька хвилин та додають під час перемішування обчислену кіль-

кість 0,2 N розчину сірчаної кислоти. Кількість 0,2 N розчину сірчаної кислоти, яку необхідно додати до осаду для розкладання солей барію органічних кислот, розраховується за формулою:

$$X = \frac{40 \times a \times K \times 0,667}{5 \times 0,2},$$

де:

X – об'єм 0,2 N розчину сірчаної кислоти, мл;

a – об'єм титрованого розчину тіосульфату натрію, витраченого під час визначення суми органічних кислот, мл;

K – нормальність розчину тіосульфату натрію;

5 – об'єм досліджуваного розчину, взятого для визначення кількості органічних кислот, мл;

40 – об'єм досліджуваного розчину, взятий для отримання осаду солей барію органічних кислот, мл;

0,2 – нормальність розчину сірчаної кислоти;

0,667 – коефіцієнт перерахунку еквівалентності органічних кислот за хромом у еквівалент за барієм.

Після додавання розчину сірчаної кислоти пробірку з реакційною сумішшю приміщують у гарячу воду на 5 хв і ретельно перемішують розчин з осадом скляною паличкою. Далі суміш охолоджують та центрифугують. Якщо осад погано відділяється від розчину, додають 3–5 мл 95 % етанолу. Прозорий розчин заливають у фарфорову чашку, а осад промивають 1 раз 5 мл 1 % оцтової кислоти, розчин центрифугують і об'єднують із першим центрифугатом. Чашку приміщують на киплячу водяну баню і вміст випаровують до висихання. Після охолодження до сухого залишку додають стільки дистильованої води, щоб отримати 4 % розчин кислот у перерахунку на яблучну кислоту та перемішують скляною паличкою до розчинення кислот. Переливають вміст у суху центрифугальну пробірку, центрифугують, зливають прозорий розчин у суху пробірку і закривають пробкою. Кількість води, яка необхідна для отримання 4 % розчину органічних кислот, розраховується за формулою:

$$Y = \frac{40 \times a \times K \times 4,47}{5 \times 4} = 8,94 \times a \times K,$$

де:

Y – об'єм дистильованої води, який потрібно додати до залишку у чашці для отримання 4 % розчину органічних кислот у перерахунку на яблучну кислоту, мл;

4 – концентрація отриманого кислотного розчину, %;

4,47 – нормальний титр яблучної кислоти, помножений на 100.

Решта показників такі самі, як і в наведеній вище формулі розрахунку об'єму 0,2 N розчину сірчаної кислоти, що використовується під час розкладання барієвих солей органічних кислот.

Якісна хроматографія

Для встановлення якісного складу органічних кислот досліджуваного розчину хроматографія на папері проводиться одночасно для дослідного зразка та розчинів-свідків. З аркушу хроматографічного паперу марки «Повільний» або «Середній», промитого соляною або щавлевою кислотою, вирізають стрічки шириною 12 см та довжиною 52 см. На 7 см нижче верхнього краю стрічки поростим олівцем наносять лінію старту, на якій розміщують точки на відстані 1,5 см з лівого і правого країв стрічки, а всередині на відстані 2 см від перших точок наносять ще 2 точки – всього 4 точки. На середні точки наносять досліджуваний розчин вільних кислот капіляром, а до двох крайніх точок наноситься розчин кислот-свідків (приблизно по 0,005 мл у кожену точку).

Дві такі стрічки з'єднуються разом скляними паличками, на кінці яких надягають гумові кільця, і приміщують у хроматографічну камеру, занурюючи верхню частину стрічки у кювету з розчинником. Стрічки загинають та розташовують по обидва боки кювети. У кювету наливають 30 мл розчинника: аміловий спирт–ацетон–45 % мурашина кислота (12:3:5) або *n*-бутанол–ацетон–45 % мурашина кислота (5:1:2). Камеру закривають кришкою та залишають до тих пір, поки фронт розчинника не досягне нижнього кінця паперової стрічки, що займає 20–24 год. Після проведення хроматографії хроматограму виймають із камери і вивішують у витяжній шафі. Після висихання їх залишають на ніч, щоб повністю видалити мурашину кислоту. На другий день хроматограму проявляють за допомогою 0,005 % розчину індикатора нафтилового червоного, який наносять на смуги папеу за допомогою пульверизатора. Кислоти проявляються плямами червоно-фіолетового кольору на жовтому фоні.

У розчиннику з аміловим спиртом кислоти рухаються в такій послідовності і з такими значеннями **R_f**: фумарова кислота (0,76), бурштинова (0,60), щавлева (0,50), яблучна (0,36), лимонна (0,28), винна (0,18). У розчиннику з *n*-бутанолом послідовність кислот така сама, а **R_f** такі: фумарова – 0,79, бурштинова – 0,67, щавлева – 0,60, яблучна – 0,47, лимонна – 0,39, винна – 0,28.

Кількісний аналіз кислот методом хроматографії на папері

Із хроматографічного паперу марки «Повільний», промитого щавлевою або соляною кислотою, вирізають стрічки довжиною 52 см та шириною 13 см. У верхній частині стрічки на відстані 7 см від верхнього краю накреслюють зону старту досліджуваного розчину із двома вирізами довжиною 20 мм і завширшки 2 мм, розташованими вертикально на краях зони нанесення і з відступом 10 мм з лівого і правого країв стрічки. Спочатку олівцем накреслюють вирізи та лінію старту. Далі стрічку приміщують на подвійний аркуш фільтрувального паперу і лезом бритви роблять вирізи (рис. 49). Після цього на лінію старту у два етапи наносять 0,1 мл розчину органічних кислот. Для цього мікропіпеткою набрати

0,05 мл розчину, протирають кінець піпетки фільтрувальним папером і торкаються кінцем піпетки початку стартової лінії, проводять кінцем піпетки лінією старту з такою швидкістю, щоб розчин розподілився рівномірно по всій довжині лінії. Розчинник видаляється з паперу шляхом сушіння, а з початку лінії наносять ще 0,05 мл досліджуваного розчину. Для кожного аналізу готують дві такі паперові стрічки, які після нанесення розчину складаються разом і кріпляться у верхній частині за допомогою двох скляних паличок, з'єднаних на краях гумовими кільцями. Скляні палички кріплять над стартовою лінією (2–3 см від верхнього краю паперу).

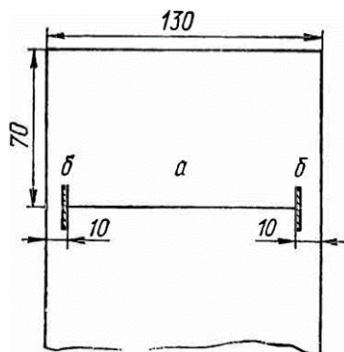


Рис. 49. Розташування обмежувальних вирізів та лінії старту на папері для хроматографії органічних кислот:
а – лінія старту;
б – обмежувальні вирізи

У кювету хроматографічної камері наливають приблизно 35 мл розчинника (аміловий спирт-ацетон-45 % мурашина кислота або п-бутанол-ацетон-45 % мурашина кислота) і невелика його кількість вноситься у чашку, яка знаходиться внизу камери. Верхня частина паперових стрічок, що виходять з паличок, занурюється у кювету з розчинником, а паперові стрічки згинаються і розташовуються по обидві боки кювети, нижні частини стрічок опускають в камеру, які закривають кришкою, і залишають на 20–25 год. Після того, як розчинник досягне нижнього краю паперової смужки, хроматограму виймають з камери, торкаючись лише скляних паличок, і підвішують у витяжній шафі за кінці паличок до наступного дня для остаточного видалення мурашиної кислоти. Наступного дня хроматограму обприскують 0,005 % розчином індикатора нафтилового червоного та висушують. Зони, заняті кислотами, забарвлюються у червоно-фіолетовий колір на жовтому фоні паперу.

Визначення вмісту окремих кислот

Після проявлення кислот їх нумерують і вирізають забарвлені зони. Зони з однаковими кислотами об'єднують з двох хроматограм, складають у гармошки, згортають та приміщують в пробірку. У пробірці з вирізаними смужками вносять 15 мл 1 % розчину оцтової кислоти і настоюють 30 хв за частого струшування. Після цього розчини зливають в фарфорові чашки, а папір у пробірках ще 2 рази промивають дистильованою водою, додаючи по 10 мл кожного разу і настоюючи 10–15 хв.

До витяжок кислот у чашках додають по 0,2 мл 20 % розчину ацетату барію та випарюють на водяній бані досуха. Сухий залишок промивають 70 % етано-

лом для видалення надлишку ацетату барію. Для цього в чашки наливають 2 мл 70 % спирту, перемішують скляною паличкою і зливають разом з осадом у центрифугальні пробірки. У чашки наливають ще 2 мл 70 % етанолу і після перемішування додають до розчину у центрифугальних пробірках. Вміст пробірок струшують протягом 3 хв, центрифугують і розчини зливають у пляшку з відпрацьованим спиртом, а осад промивають ще 2 рази, додаючи 3 мл 70 % етанолу і промиваючи чашки. До промитого осаду додають 3 мл 0,1 N розчину соляної кислоти, промиваючи нею спочатку чашку. До отриманого розчину додають 1 мл 0,5 N розчину біхромату калію, розчини змішують, додають 2 мл 30 % розчину ацетату натрію, знову перемішують, пробірки занурюють у гарячу воду і залишають на 5 хв. Після охолодження їх центрифугують, розчин зливають, а осад промивають 2 рази дистильованою водою порціями по 5 мл.

До промитого осаду хромату барію додають 10 мл 1 N розчину соляної кислоти, перемішують до розчинення та переносять розчин у колби для титрування, змиваючи залишки водою. У колби додають 1 мл 20 % розчину йодиду калію та титрують утворений йод 0,01 N розчином тіосульфату натрію у присутності крохмалю до зникнення синього забарвлення. За результатами титрування обчислюють вміст кислот за такою формулою:

$$X = \frac{0,1 \times 50 \times E \times K \times a \times V}{40 \times V_1 \times n} = \frac{0,125 \times E \times K \times a \times V}{V_1 \times n},$$

де:

X – вміст цієї кислоти в дослідному матеріалі, %;

E – еквівалент визначеної кислоти: винна – 50, лимонна – 42,7, щавлева – 30,1, яблучна – 44,7, бурштинова – 39,4, малоновна – 34,7, фумарова – 38,7;

K – нормальність розчину тіосульфату натрію;

a – об'єм розчину тіосульфату натрію, витрачений на титрування для визначення певної кислоти, мл;

V – об'єм 4 % розчину вільних кислот, отриманого з 40 мл дослідного розчину, мл;

V₁ – об'єм 4 % розчину вільних кислот, що нанесений на хроматограму (на двох стрічках паперу), мл;

n – наважка рослинного матеріалу, г;

50 – загальний об'єм дослідного розчину, мл;

40 – об'єм дослідного розчину, використаний для отримання 4 % розчину вільних кислот;

0,1 – коефіцієнт перерахунку міліграмів у відсотки.

Обладнання

- 1) хроматографічні камери; 2) хроматографічний папір; 3) центрифуга;
- 4) центрифугальні пробірки; 5) фарфорові чашки; 6) хімічні склянки; 7) піпетки;

8) конічні колби ємністю 50 та 100 мл; 9) мікропіпетки; 10) бюретки для титрування; 11) водяна баня; 12) повітряна баня.

Реактиви

1) оцтова кислота (CH_3COOH) 1 % розчин; 2) ацетат барію ($(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Ba}$) 20 % розчин; 3) етанол ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) 70 % розчин; 4) хлорна кислота (HClO_4) 42 % розчин; 5) азотна кислота (HNO_3) концентрована; 6) соляна кислота (HCl) 0,1 N та 1 N розчини; 7) біхромат калію ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) 0,5 N розчин; 8) ацетат натрію (CH_3COONa) 30 % розчин; 9) йодид калію (KI) 20 % розчин; 10) тіосульфат натрію ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 0,01 N розчин; 11) сірчана кислота (H_2SO_4) 0,2 N розчин; 12) аміловий спирт ($\text{C}_5\text{H}_{11}\text{OH}$); 13) ацетон ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$); 14) мурашина кислота (HCOOH) 45 % розчин; 15) n-бутанол ($\text{C}_4\text{H}_9\text{OH}$); 16) індикатор нафтиловий червоний; 17) діментиловий жовтий + бромфеноловий синій.

Приготування реактивів

Реактив № 11 (0,2 N розчин сірчаної кислоти). Спочатку готують 2 N розчин сірчаної кислоти. Для цього до 0,5 л дистильованої води доливають 50 мл сірчану кислоту густиною 1,84, перемішують, охолоджують, розводять водою до 1 л і знову перемішують. Цей розчин розбавляють у 10 разів водою. Нормальність отриманого розчину встановлюють за бурою, використовуючи як індикатор метилоранж або метиловий червоний. Концентрацію доводять до 0,2 N розведенням водою.

Реактив № 14 (45 % розчин мурашиної кислоти). Готують із більш концентрованих розчинів, розраховуючи необхідну для приготування 100 мл 45 % розчину кількість кислоти за формулою:

$$X = \frac{1,109 \times 45 \times 100}{d \times c} = \frac{4990}{d \times c},$$

де:

X – об'єм розведеної кислоти, мл;

c – концентрація розведеного розчину кислоти, ваг. %;

d – густина розчину кислоти, який потрібно розвести.

Більш міцний розчин acid1 поміщують у мірчу колбу по 100 мл, розводять дистильованою водою на етикетку і ретельно промивають.

Розчинники для кислотної хроматографії. Для приготування розчинника на основі амілового спирту у хімічній склянці змішують 24 мл амілового спирту з 6 мл ацетону та 10 мл 45 % водного розчину мурашиної кислоти. Отриману суміш ретельно перемішують скляною паличкою до отримання однорідного розчину.

Для приготування розчинника на основі n-бутанолу у хімічну склянку ємністю 100–200 мл наливають 25 мл n-бутанолу, 5 мл ацетону та 10 мл 45 % розчину мурашиної кислоти. Суміш перемішують для отримання однорідної рідини.

Реактив № 16 (проявник органічних кислот). 0,1 г нафтилового червоного розчиняють у 200 мл 95 % етанолу. Перед використанням цього розчину його розводять у 10 разів за об'ємом 50 % етанолом.

Реактив № 17 (складний проявник органічних кислот). 0,1 г диметилового жовтого та 0,2 г бромфенолового синього розчиняють у 120 мл 95 % етанолу, додають 1 мл 2 N розчин гідроксиду натрію та доводять об'єм розчину дистильованою водою до 200 мл. Перед використанням проявник розводять 50 % етанолом у 10 разів. Цей проявник не дуже якісно виявляє бурштинову кислоту. На зеленкувато-блакитному тлі з'являються плями кислот від жовтого до червоного кольору залежно від сили кислот. Перехід забарвлення індикатору відбувається за рН в інтервалі від 2,9 до 4,6.

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАТЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Наведіть принцип методу хроматографічного визначення органічних кислот.
2. Як проводиться вилучення органічних кислот із рослинного матеріалу та їх очистка від домішок?
3. Як і для чого проводиться визначення загальної кількості органічних кислот у рослинному матеріалі?
4. Як проводиться підготовка та проведення хроматографічного розділення органічних кислот?
5. Охарактеризуйте методи ідентифікації органічних кислот. У роботі наводяться 2 проявники, чим вони відрізняються?
6. Охарактеризуйте процедуру кількісного визначення індивідуальних органічних кислот. Як проводиться обчислення результатів?
7. Порівняйте метод хроматографічного розділення кислот, запропонований Х. Н. Починком із попереднім методом (робота 12.11).

РОБОТА 12.13. ВИЗНАЧЕННЯ КІЛЬКОСТІ ЛІГНІНУ

Лігнін міститься в одеревілих рослинних тканинах поряд із целюлозою та геміцелюлозами. Він інкрустує целюлозні фібрили, беручи участь в утворенні опорних елементів рослинних тканин. Лігнін є аморфною речовиною коричневого кольору, яка частково розчиняється в органічних розчинниках (етанол, ацетон) та добре розчиняється у бісульфіті натрію і сірчаній кислоті. За хімічною будовою лігнін – тримірний полімер фенольної природи. Мономерами є коричневі спирти (п-оксикоричний, коніферіловий, синаповий та інші).

Принцип методу. Лігнін очищується від супутніх речовин послідовною обробкою дослідного матеріалу 1 % оцтовою кислотою (для видалення цукрів, органічних кислот та інших розчинних речовин), ацетоном або сумішшю етило-

вого спирту та ефіру 1 : 1 (для видалення хлорофілу, ліпідів, смол та інших розчинних у органічних розчинниках речовин) та 72 % сірчаною кислотою (для видалення целюлози та геміцелюлоз). Після промивання залишку дистильованою водою від продуктів гідролізу лігнін окислюється біхроматом калію в присутності сірчаної кислоти. Надлишок біхромату калію визначається титруванням сіллю Мора або йодометричним методом.

Перебіг аналізу. Зважують на аналітичних терезах 0,05–0,1 г подрібненого сухого або 0,2–0,5 г сирого дослідного матеріалу (у наважці повинно бути від 2 до 18 мг лігніну). Сухий матеріал висипають у центрифугальну пробірку і додають 10 мл 1 % розчину оцтової кислоти. Сирий матеріал розтирають у ступці з 5 мл 1 % розчину оцтової кислоти та переносять у центрифугальну пробірку, змиваючи залишок у ступці порціями оцтової кислоти. Вміст пробірки мішають протягом 5 хв та центрифугують. Розчин зливають, а осад промивають ще один раз 5 мл 1Т % оцтової кислоти, знову центрифугують. Далі осад промивають 3 рази ацетоном або сумішшю етанолу та етилового ефіру, додаючи її порціями по 3–4 мл. Кожного разу осад перемішують із промивною рідиною, витримують 3 хв і центрифугують. Після промивання осад розподіляють по стінках пробірки скляною паличкою, пробірку нагрівають у водяній бані до повного висихання осаду. До сухого осаду у пробірці додають 3 мл 72 % розчину сірчаної кислоти (густина 1,63) перемішують скляною паличкою, руйнуючи грудки осаду, до отримання однорідної маси. Далі суміш залишають на 16 год (частіше на ніч) за кімнатної температури для розчинення целюлози.

Наступного дня у пробірку додають 10 мл дистильованої води, розмішують скляною паличкою, і занурюють у киплячу воду на 5 хв. Розчин охолоджують, додають 5 л дистильованої води, 0,5 мл 10 % розчину хлориду барію і розмішують. Хлорид барію з сірчаною кислотою утворює важкий осад сульфату барію, який тягне за собою більш легкий лігнін, що полегшує центрифугування та відокремлення надосадової рідини. Рідину центрифугують, прозорий розчин зливають по скляній паличці, а осад двічі промивають водою (кожного разу додають по 10 мл води, ретельно перемішують та центрифугують). До промитого осаду лігніну додають 10 мл 0,5 N розчину біхромату калію в сірчаній кислоті, занурюють пробірку у киплячу воду на 15 хв, періодично перемішують розчин скляною паличкою. Рідину охолоджують і переносять в колбу для титрування, змиваючи залишки 15–20 мл дистильованої води. До охолодженого розчину, який містить надлишок біхромату калію, додають 60 мл дистильованої води для розведення сірчаної кислоти, охолоджують, додають 5 мл 20 % розчину йодиду калію та титрують йод, який утворюється під час взаємодії йодистого калію та біхромату калію, 0,1 N розчином тіосульфату натрію у присутності 1 мл 0,5 % розчину крохмалю. Окремо титрують 10 мл 0,5 N розчину біхромату калію, роз-

веденого водою (приблизно 80 мл води, контрольне титрування). За отриманими результатами обчислюють кількість лігніну за такою формулою:

$$X = \frac{0,433 \times K(a - b)}{n},$$

де:

X – вміст лігніну, %;

a – об'єм 0,1 N розчину тіосульфату натрію, який витрачено на титрування 10 мл 0,5 N розчину біхромату калію, мл;

b – об'єм 0,1 N розчину тіосульфату натрію, який витрачено на титрування надлишку біхромату у дослідному зразку, мл;

K – нормальність титрованого розчину тіосульфату натрію;

n – наважка дослідного матеріалу, г;

0,433 – нормальний титр лігніну, помножений на 100.

Обладнання

1) ступка з товкачиком; 2) центрифуга та центрифугальні пробірки; 3) скляні палички; 4) колби конічні ємністю 250 мл; 5) піпетки на 1, 5 та 10 мл; 6) водяна баня; 7) електрична плита; 8) бюретка для титрування.

Реактиви

1) оцтова кислота (CH_3COOH) 1 % розчин; 2) ацетон або суміш етанолу з етиловим ефіром у співвідношенні 1 : 1; 3) сірчана кислота (H_2SO_4) 72 % розчин (густина 1,63); 4) хлорид барію (BaCl_2) 10 % розчин; 5) біхромат калію ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) 0,5 N розчин; 6) йодид калію (KI) 20 % розчин; 7) тіосульфат натрію ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 0,1 N розчин (готується з фіксаналу); 8) крохмаль 0,5 % розчин.

Приготування реактивів

Реактив № 5 (розчин біхромату в сірчаній кислоті (0,5 N)). 25 г біхромату калію ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) розчиняють у 250 мл дистильованої води в колбі об'ємом не менше 2 л і поступово додають 300 мл концентрованої сірчаної кислоти (густина 1,84). Ретельно перемішують, охолоджують та переливають у пляшку з темного скла.

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАТЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Яка будова молекули лігніну? Значення лігніну у життєдіяльності рослин.
2. Дайте характеристику принципу методу визначення лігніну.
3. Які речовини, що містяться в рослинному матеріалі, заважають визначенню лігніну? Як їх видалити?
4. Яка залежність існує між вмістом лігніну в рослинному матеріалі та кількістю тіосульфату натрію, який використовується для титрування дослідного зразка?

РОБОТА 12.14. ВИЗНАЧЕННЯ СУМИ СИРОГО ФІЛІЦИНУ У КОРЕНЕВИЩАХ ПАПОРОТНИКІВ

Кореневища чоловічого папоротнику містять так званий сирий філіцин (до 5 %), до складу якого входять флороглюциди різної будови – аспідинол, альбаспідин тощо. Препарати, отримані з кореневищ чоловічого папоротнику, мають певні лікувальні властивості та використовуються у медицині.

Принцип методу. Флороглюциди екстрагують етиловим ефіром, далі звільняють від розчинника, сушать та визначають їх масу.

Перебіг аналізу. 50 г порошку кореневищ екстрагують приблизно 2 год у апараті Сокслета етиловим ефіром до тих пір, поки ефір не буде стікати безбарвним і 10 мл ефірного екстракту не перестануть залишати після випаровування видимого залишку. Екстракт фільтрують, ефір впарюють на водяній бані до 30 мл, після чого залишок збовтують у ділительній лійці з 30 мл насиченого розчину гідроксиду барію протягом 5 хв. Після розділення шарів водний шар фільтрують. 24 мл фільтрату (40 г сировини) змішують із 4 мл концентрованої HCl та послідовно збовтують із 30, 20 та 15 мл етилового ефіру, а отриману рідину об'єднують. Об'єднані ефірні екстракти зневоднюють 4 г безводного Na₂SO₄ і фільтрують через скляний фільтр у зважену колбу. Сульфат натрію та фільтр промивають етиловим ефіром двічі по 10 мл. Ефір відганяють на водяній бані, а залишок сушать протягом 1 год за температури 100 °С. Процентний вміст філіцину розраховують за формулою:

$$X = \frac{n_1 \times 100 \times 100}{n_2 \times (100 - n_3)},$$

де

X – вміст філіцину у рослинній сировині, %;

n_1 – кількість сирого філіцину, отриманого після відгонки етилового ефіру, г;

n_2 – маса наважки сировини, обчислена за об'ємом фільтрату, г;

n_3 – втрата маси сировини під час висушування, г.

Вміст сирого філіцину у кореневищах повинен бути не менше 1,8 %.

Обладнання

1) апарат Сокслета; 2) лабораторна сушильна шафа; 3) колба круглодонна зі зворотним холодильником обсягом 500 мл; 4) водяна баня; 5) лійки; 6) фільтри паперові; 7) колби конічні об'ємом 100 мл; 8) аналітичні терези; 9) ступки фарфорові.

Реактиви

1) етиловий ефір (C₄H₁₀O); 2) гідроксид барію (Ba(OH)₂) насичений розчин; 3) соляна кислота (HCl) концентрована; 4) сульфат натрію (Na₂SO₄) безводний.

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАЇ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Які речовини називаються фенольними сполуками?
2. Вкажіть, на які групи поділяються фенольні сполуки.
3. Наведіть характеристику принципу методу.
4. Як проводиться аналіз?
5. Як обчислюються результати визначення?

РОБОТА 12.15. ВИЗНАЧЕННЯ СУМИ КСАНТОНІВ

Назва походить від грецького *xanthos*, що означає «жовтий», тому що речовини мають зазвичай кремовий або жовтий колір. Перший представник цієї групи був виділений Генрі у 1821 р. з коренів *Gentiana lutea* і названий гентизином. Пізніше була встановлена та підтверджена структура – 1,7-диоксиз-3-метоксиксанта. У 1901 р. Вієговські з листя манго *Mangifera indica* род. Anacardiaceae одержав кристалічну речовину і назвав її мангінном. Структура його була встановлена у 1957 р. як 1,4,5,7-тетраоксиксантон. Із плодів манго Ізедіа виділив жовту кристалічну речовину, яку назвав мангіферинном. Пізніше було доведено його структуру. У 1961 р. описано 17 природних ксантонів, у 1969 р. відомо вже понад 70 сполук: 20 речовин із родини Gentianaceae, 50 – із родини Clusiaceae (Hypericaceae). Тепер виділено і вивчено понад 300 ксантонових сполук із 150 рослин родин тирличеві, китяткові, клузіїві, тутові тощо.

Принцип методу. Суму ксантонів екстрагують із рослинної сировини етанолом у присутності соляної кислоти, з наступним перенесенням ксантонів у 95 % етанол. Їх вміст визначають, вимірюючи оптичну густину продукту реакції ксантонів зі спиртовим розчином хлориду алюмінію на спектрофотометрі за довжини хвилі 410 нм. Для порівняння використовують стандартний розчин алпізарину.

Перебіг аналізу. Аналітичну пробу рослинної сировини подрібнюють до розміру часток, які проходять крізь сито з діаметром отворів 2 мм. Наважку приблизно 5 г (фіксують із точністю до 0,01 г) приміщують у колбу об'ємом 250–300 мл, додають 150 мл 60 % етанолу, який містить 5 % соляної кислоти. Колбу зі вмістом зважують із точністю $\pm 0,01$ г, під'єднують до зворотного холодильника та екстрагують на киплячій водяній бані протягом 3 год. Колбу охолоджують до кімнатної температури, зважують із точністю $\pm 0,01$ г та доводять масу до початкової сумішшю 60 % етанолу з соляною кислотою. Отриманий екстракт фільтрують через лійку діаметром 70 мм із паперовим фільтром у колбу місткістю 250 мл, перші 5 мл фільтрату відкидають. 2 мл спиртового екстракту вносять у колонку діаметром 2 см та висотою 28 см з 1,5 г поліамідного сорбенту для колоночної хроматографії. Для приготування сорбенту 300 г гранул поліаміду приміщують у колбу на 5 л, додають 1,5 л концентрованої оцтової кислоти

та нагрівають на електричній пічці із закритою спіраллю до повного розчинення гранул. Отриманий розчин охолоджують. Осад, що випав, фільтрують на лійці Бюхнера під вакуумом та промивають водою до нейтральної реакції. Промитий та профільтований поліамід переносять у круглодонну колбу місткістю 3 л, додають 1,65 л 80 % етанолу та кип'ятять на водяній бані зі зворотним холодильником протягом 1 год. Осад фільтрують на лійці Бюхнера під вакуумом і промивають 1,5 л ацетону. Отриманий поліамід сушать у витяжній шафі протягом 30–40 хв, після чого протирають щіткою через сито № 10 із діаметром отворів 1 мм. Отриманий продукт насипають на пергаментний папір та сушать на повітрі протягом 10 год. Готовий поліамід зберігають у скляних банках із притертими пробками. Приготування колонки проводять так: 1,5 г поліамідного сорбенту приміщують у склянку місткістю 50 мл, додають 30 мл води, перемішують та переносять завис у колонку з пористим скляним фільтром, на який приміщений ватний тампон, попередньо змочений дистильованою водою. Колонку заповнюють за умови відкритого спускного крану, зливають воду, залишивши шар 1 см над сорбентом. Колонку, заповнену підготовленим сорбентом і зі внесеним екстрактом, промивають дистильованою водою (50 мл) зі швидкістю 2,5–4 мл/хв, водний елюат відкидають. Суму ксантонів елюють 50 мл 95 % етанолу, контролюючи їх рух у видимому та ультрафіолетовому світлі за жовтою зоною. Після досягнення зоною нижньої частини сорбенту елюат цієї зони збирають у мірчу колбу місткістю 50 мл. Об'єм елюату доводять до мітки 95 % етанолом і ретельно перемішують.

До 5 мл елюату додають 5 мл 0,05 М спиртового розчину хлориду алюмінію і через 15–20 хв вимірюють оптичну густину отриманої суміші на спектрофотометрі за довжини хвилі 410 нм у кюветі з оптичним шляхом 10 мм на фоні контрольного зразка.

Паралельно визначають оптичну густину розчину стандартного зразка алпізарину у суміші з 0,05 М спиртовим розчином хлориду алюмінію. Для його проведення колонку з поліамідом, підготовлену, як наведено для дослідного зразка, промивають 50 мл дистильованої води із швидкістю 3,5–4 мл/хв. Водний елюат відкидають і колонку промивають 50 мл 95 % етанолом, який збирають у мірчу колбу ємністю 50 мл, далі доводять об'єм елюату етанолом до мітки і перемішують.

Процентний вміст суми ксантонів у перерахунку на алпізарин та абсолютно суху масу рослинної сировини обчислюють за формулою:

$$X = \frac{300 \times D \times n_0 \times 100}{D_0 \times m \times (100 - b)},$$

де:

D – оптична густина дослідного розчину;

D_0 – оптична густина стандартного розчину алпізарину;

n – маса рослинної сировини, г;

n_0 – наважка стандартного зразка алізарину, г;

b – втрата маси під час сушіння сировини, %.

Обладнання

1) аналітичні терези; 2) сито з діаметром отворів 2 мм; 3) конічні колби місткістю 250–300 мл зі зворотним холодильником; 4) водяні бані; 5) лійки; 6) фільтри; 7) хроматографічні колонки; 8) мірчі колби об'ємом 50 мл; 9) пробірки; 10) спектрофотометр.

Реактиви

1) етанол (C_2H_5OH) 96 % розчин; 2) соляна кислота (HCl) 5 % розчин 3) поліамідний сорбент; 4) хлорид алюмінію ($AlCl_3$) 0,05 М спиртовий розчин; 5) стандартний розчин алізарину.

Приготування реактивів

Реактив № 4 (0,05 М розчин хлориду алюмінію у етанолі). 12,5 г хлориду алюмінію примішують у мірчу колбу об'ємом 1 л, розчиняють вміст колби у 95 % етанолі та доводять об'єм розчину етанолом до мітки. Термін зберігання становить 1 міс.

Реактив № 5 (стандартний розчин алізарину). 0,05 г (точна наважка) алпізарину-стандарту (у перерахунку на 100 % речовину) розчиняють у суміші ацетон–вода (1 : 1) у мірчій колбі на 100 мл. 1 мл отриманого розчину переносять у мірчу колбу об'ємом 25 мл і доводять об'єм розчину 95 % етанолом до мітки. Зберігається протягом 1 міс.

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАТЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Охарактеризуйте ксантони. Хімічна природа, значення для рослин.
2. Наведіть характеристику принципу методу.
3. Як проводиться аналіз?
4. Як обчислюються результати визначення?

РОБОТА 12.16. ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ФУРОКУМАРИНІВ У ПЛОДАХ

У плодах амі великої (*Ammi majus*, родина селерові – *Ariaseae*) міститься 0,5 % фурукумаринів, серед яких основними є бергаптен та ізопімпінелін. Плоди використовують як сировину для отримання лікарських препаратів.

Принцип методу. Кількісне визначення цих сполук здійснюють після проведення хроматографії спектрофотометричним методом.

Перебіг аналізу. 2 г подрібненого рослинного матеріалу просівають через сито з розміром отворів 0,16 мм, примішують у паперові пакети та вилучають досліджувані речовини зі 120 мл хлороформу у апараті Сокслета протягом 2 год

(12–15 зливів). Хлороформовий екстракт фільтрують та упарюють у вакуумі до суха. Сухий залишок розчиняють під час слабкого нагрівання у хлороформі та кількісно переносять у калібрований пікнометр на 5 мл. 0,02 мл отриманого розчину наносять мікропіпеткою на старт хроматограми. Хроматограму надалі обробляють 10 % розчином формаміду у метанолі, сушать на повітрі протягом 4 хв та проводять хроматографування висхідним способом у системі розчинника н-гептан–бензол (4 : 1) за температури 19–20 °С протягом 5–6 год на папері марки «С». Далі хроматограму сушать у сушильній шафі протягом 2 год за температури 40–50 °С та переглядають в УФ-світлі. Плями бергаптену з R_f 0,63 та ізопімпініліну з R_f 0,53 обводять олівцем і вирізають. Вирізані ділянки паперу поміщують у колби зі шліфом ємністю 10–15 мл, заливають 5 мл 95 % етанолу та залишають на 10–12 год, далі нагрівають на водяній бані за температури приблизно 40 °С протягом 10 хв. Елюат фільтрують і вимірюють оптичну густину на спектрофотометрі у кюветі з товщиною шару 1 см проти елюату чистого шматка тієї самої хроматограми. Оптичну густину вимірюють за наступних довжин хвиль: ізопімпініліну – 313 нм, бергаптену – 311 нм.

Вміст ізопімпініліну та бергаптену обчислюють за формулою:

$$X = \frac{V_1 \times V_3 \times D_2 \times 1,045 \times 100}{V_2 \times n \times D \times (100 - b)},$$

де:

X – вміст досліджуваних речовин у рослинному матеріалі, %;

V_1 – загальний об'єм екстракту, мл;

V_2 – об'єм екстракту, нанесеного на хроматограму, мл;

V_3 – об'єм елюату, мл;

n – наважка рослинного матеріалу, г;

D_2 – оптична густина елюату;

D – питомий коефіцієнт поглинання світла: ізопімпінілін – 518, бергаптен – 651;

b – вміст води, %.

Вміст ізопімпініліну в рослинному матеріалі повинен бути не менше 0,3 %, бергаптену – не менше 0,15 % у перерахунку на абсолютно суху речовину.

Обладнання

1) папір хроматографічний марки «С»; 2) бюкси з притертими кришками; 3) пікнометри на 5 мл; 4) мірчі мікропіпетки на 0,2 мл; 5) колби зі шліфом ємністю 10–15 мл; 6) лійки; 7) терези лабораторні аналітичні; 8) набір сит; 9) апарат Сокслета; 10) камери хроматографічні для тонкошарової хроматографії; 11) шафа сушильна лабораторна; 12) УФ-лампа; 13) бані водяні лабораторні; 14) спектрофотометр.

Реактиви

1) хлороформ; 2) метанол; 3) формамід; 4) н-гептан; 5) бензол; 6) етанол.

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Охарактеризуйте речовини, що підлягають визначенню. Хімічна природа, значення для рослин, використання людиною.
2. Наведіть характеристику принципу методу.
3. Як проводиться аналіз?
4. Як обчислюються результати визначення?

РОБОТА 12.17. ВИЗНАЧЕННЯ СУМИ ХРОМОНІВ У ПЛОДАХ АМІ ЗУБНОЇ

В усіх частинах рослини містяться хромони, основним із яких є фуранохромон, кількість якого може сягати 2,5 %. Із плодів виготовляють препарат келін, який застосовують для лікування хронічної стенокардії.

Принцип методу. Кількісне визначення цих сполук проводять колориметричним методом у перерахунку на келін, використовуючи стандартний розчин.

Перебіг аналізу. 0,25 г подрібненого рослинного матеріалу приміщують у колбу ємністю 150 мл, додають 50 мл дистильованої води та кип'ятять зі зворотним холодильником протягом 30 хв. До киплячої суміші додають 2 мл 10 % розчину ацетату свинцю і продовжують кип'ятити ще 3 хв. Гарячу суміш фільтрують на лійці Бюхнера за умови невеликого вакууму. Колбу та матеріал на фільтрі промивають тричі по 30 мл киплячою водою. Фільтрат кількісно переносять у склянку ємністю 250 мл, додають 1 г однозаміщеного фосфату натрію та кип'ятять ще 3 хв. Гарячий розчин фільтрують безпосередньо у ділильну ліжку; склянку та фільтр промивають тричі по 30 мл киплячою водою і охолоджують до кімнатної температури. Водний розчин збовтують із хлороформом 4 рази по 25 мл, об'єднані хлороформові екстракти промивають 5 мл дистильованої води, відокремлюючи воду, зневоднюють, фільтруючи в колбу ємністю 200 мл через паперовий фільтр із 2 г безводного сульфату натрію, попередньо змочений хлороформом. Фільтр тричі промивають хлороформом по 10 мл у ту саму колбу. Надалі хлороформ відганяють на водяній бані досуха, до залишку додають 80 мл 10 N розчину сірчаної кислоти, розчиняють його обережно, нагріваючи, та охолоджують розчин. Далі охолоджений кислий розчин кількісно переносять у мірчу колбу ємністю 100 мл, об'єм розчину доводять до мітки дистильованою водою, перемішують та залишають на 5–10 хв.

Невелику частину розчину фільтрують і визначають його оптичну густину в кюветі з оптичним шляхом 1 см за довжини хвилі 465 нм. Як контрольний розчин використовують дистильовану воду. Обчислення вмісту дослідної речовини проводять за калібрувальним графіком.

Вміст суми хромонів у рослинному матеріалі розраховують за формулою:

$$X = \frac{C \times 100 \times 100}{n \times (100 - b) \times 1\,000'}$$

де:

X – вміст хромонів у рослинному матеріалі, %;

C – концентрація хромонів, знайдена за калібрувальним графіком, мг/мл;

n – наважка рослинного матеріалу, г;

b – вологість рослинного матеріалу, %.

Для побудови калібрувального графіка використовують стандартний розчин коліну. Вміст хромонів у перерахунку на абсолютно суху речовину повинен бути не менше 0,8 %.

Обладнання

1) аналітичні терези; 2) електрична кавомолка; 3) сита з діаметром отворів 0,1 мм; 4) колби об'ємом 150 мл зі зворотним холодильником; 5) лійки Бюхнера; 6) склянки ємністю 250 мл; 7) ділільні лійки ємністю 300 мл; 8) водяна баня; 9) фарфорові чашки; 10) паперові фільтри; 11) колби об'ємом 250 мл; 12) мірчі колби об'ємом 100 мл; 13) фотоелектроколориметр або спектрофотометр.

Реактиви

1) ацетат свинцю ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) 10 % розчин; 2) фосфат натрію однозаміщений (NaH_2PO_4); 3) хлороформ; 4) сульфат натрію (Na_2SO_4) безводний; 5) сірчана кислота (H_2SO_4) 10 N розчин; 6) дистильована вода.

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Охарактеризуйте речовини, що підлягають визначенню. Хімічна природа, значення для рослин, використання людиною.
2. Наведіть характеристику принципу методу. Охарактеризуйте метод колориметрії.
3. Як проводиться аналіз?
4. Як обчислюються результати визначення? Наведіть методику побудови калібрувального графіка.

РОБОТА 12.18. ВИЗНАЧЕННЯ СУМИ АНТОЦΙΑНІВ

Принцип методу. Кількісне визначення суми антоціанів проводиться спектрофотометричним методом, шляхом виміру оптичної густини кислотного екстракту.

Перебіг аналізу. Аналітичну пробу рослинного матеріалу ретельно подрібнюють до розміру часток не більше 1 мм. 0,3 г матеріалу переносять у колбу Ерленмеєра ємністю 250 мл, додають 100 мл 1 % розчину соляної кислоти, колбу витримують на водяній бані за температури 40–45 °C 15 хв. Екстракт фільтру-

ють через вату в мірчу колбу об'ємом 250 мл. Вату з рослинним матеріалом ще раз екстрагують, додаючи 100 мл 1 % розчину соляної кислоти, попередньо змиваючи частки матеріалу з лійки в колбу для екстракції. Екстракцію проводять за методом, наведеним вище. Далі вміст колби фільтрують через вату у мірчу колбу, об'єднуючи фільтрати. Рослинний матеріал на лійці промивають 40 мл 1 % розчину соляної кислоти. Після охолодження фільтрату його об'єм доводять 1 % розчином соляної кислоти до мітки. Отриманий екстракт фільтрують через паперовий фільтр, відкидаючи перші 10 мл фільтрату. Далі вимірюють оптичну густину фільтрату на спектрофотометрі за довжини хвилі 510 нм у кюветі з оптичним шляхом 10 мм. Як розчин порівняння використовують 1 % розчин НСl.

Вміст суми антоціанів у перерахунку на ціанідин-3,5-діглюкозид в абсолют-но сухому зразку обчислюють за формулою:

$$X = \frac{D \times 250 \times 100}{453 \times n \times (100 - b)},$$

де:

X – вміст суми антоціанів у рослинному матеріалі, %;

D – оптична густина дослідного розчину;

453 – питоме поглинання ціанід-3,5-диглюкозиду у 1 % розчині соляної кислоти;

n – наважка рослинного матеріалу, г;

b – втрата маси рослинного матеріалу за висушування, %.

Обладнання

1) аналітичні терези; 2) сита з діаметром отворів 1 мм; 3) електрична каво-молка; 4) колби місткістю 250 мл; 5) водяна баня; 6) лійки; 7) фільтри; 8) мірчі колби об'ємом 100 мл; 9) спектрофотометр.

Реактиви

1) соляна кислота (НСl) 1 % розчин.

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Охарактеризуйте речовини, що підлягають визначенню. Хімічна приро-да, значення для рослин.

2. Наведіть характеристику принципу методу. Охарактеризуйте метод фото-метрії.

3. Як проводиться аналіз?

4. Як обчислюються результати визначення?

РОБОТА 12.19. ВИЗНАЧЕННЯ СУМИ ФЛАВОНОЇДІВ У РОСЛИННОМУ МАТЕРІАЛІ

Принцип методу. Флавоноїди екстрагують із рослинного матеріалу етанолом. Їх кількість визначають за оптичною густиною на спектрофотометрі.

Перебіг аналізу. 5 г подрібненого та просіяного через сито з діаметром отворів 2 мм рослинного матеріалу примішують у патрон із фільтрувального паперу та екстрагують 95 % етанолом у апараті Сокслета ємністю 150 мл протягом 5 год. Екстракт упарюють досуха. Сухий залишок обробляють 5 мл 10 % розчину хлориду натрію на киплячій водяній бані протягом 2 хв, після охолодження розчин зливають у колонку з поліамідним сорбентом. Для приготування колонки 1,5 г поліамідного сорбенту примішують у склянку ємністю 50 мл, заливають 30 мл дистильованої води, перемішують та виливають через лійку ($d = 3,5$ см) у колонку $d = 1,2$ см, $h = 25$ см, у нижній частині якої знаходиться невеликий ватний тампон, змочений дистильованою водою. Колонку заповнюють за умови відкритого крану. Елюацію проводять зі швидкістю 4 мл/хв. Операцію проводять двічі. Злив здійснюють через лійку з ватним тампоном, попередньо змоченим дистильованою водою. Колонку промивають 30 мл дистильованої води, з яких 10 мл застосовують для промивання ватного тампону, який далі прибирають. Водний елюат відкидають. Флавоноїди елюють 50 мл 95 % етанолу, контролюючи їх переміщення у видимому та УФ-світлі у вигляді темно-жовтої зони. Коли зона дійде до нижньої частини сорбенту, її збирають у мірчу колбу об'ємом 50 мл. Об'єм елюату доводять до мітки 95 % етанолом та ретельно перемішують. 1 мл елюату переносять у мірчу колбу об'ємом 50 мл, об'єм доводять до мітки 95 % етанолом і перемішують. Вимірюють оптичну гуστину розчину на спектрофотометрі за довжини хвилі 338 нм у кюветі з оптичним шляхом 10 мм проти контрольного розчину. Паралельно визначають оптичну гуστину стандартного розчину біхромату калію, використовуючи для порівняння 0,005 М розчину сірчаної кислоти.

Вміст суми флавоноїдів у абсолютно сухому матеріалі обчислюють за формулою:

$$X = \frac{0,2020 \times 50 \times 50 \times 1,03 \times n_1 \times D \times 100 \times 100}{n \times D_0 \times 1\,000 \times (100 - b)},$$

де:

X – вміст суми флавоноїдів у рослинному матеріалі, %;

$0,2020$ – коефіцієнт перерахунку біхромату калію на флавоноїди;

50 – об'єм екстракту, мл;

50 – додаткове розведення;

$1,03$ – поправочний коефіцієнт на неповне елюювання флавоноїдів з поліамідного сорбенту;

n – маса рослинного матеріалу, г;

m_1 – маса біхромату калію, взятого для приготування стандартного розчину, г;
 D – оптична густина дослідного розчину;
 D_0 – оптична густина стандартного розчину біхромату калію;
 $1\ 000$ – об'єм стандартного розчину біхромату калію, мл;
 b – втрата маси зразка під час висушування, %.

Обладнання

1) аналітичні терези; 2) сита з отворами діаметром 2 мм; 3) апарат Сокслета; 4) чашки фарфорові; 5) водяна баня; 6) хроматографічні колонки; 7) мірчі колби об'ємом 50 мл; 8) фільтрувальний папір; 9) спектрофотометр.

Реактиви

1) етанол (C_2H_5OH) 95 % розчин; 2) хлорид натрію ($NaCl$) 10 % розчин; 3) поліамідний сорбент; 4) контрольний розчин; 5) сірчана кислота (H_2SO_4) 0,005 М розчин; 6) біхромат калію ($K_2Cr_2O_7$) стандартний розчин.

Приготування реактивів

Реактив № 4. Контрольний розчин отримують шляхом пропускання 50 мл 95 % етанолу через колонку у мірчу колбу об'ємом 50 мл, об'єм розчину доводять 95 % етанолом до мітки.

Реактив № 5 (0,005 М розчин сірчаної кислоти). Беруть 1 л дистильованої води, доливають 0,28 мл сірчаної кислоти (густина 1,83) та перемішують. Термін придатності розчину 3 міс.

Реактив № 6 (стандартний розчин біхромату калію). 0,0300 г біхромату калію розчиняють у 0,005 М розчині сірчаної кислоти у мірчій колбі об'ємом 1 л, доводять об'єм розчину до мітки розчином сірчаної кислоти і перемішують. Термін придатності розчину 3 міс.

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАТЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Охарактеризуйте речовини, що підлягають визначенню. Хімічна природа, значення для рослин.
2. До якої групи речовин вторинного походження належать флавоноїди? У чому їх відмінність від інших сполук цього класу?
3. Наведіть характеристику принципу методу. Охарактеризуйте метод фотометрії.
4. Як проводиться аналіз?
5. Як обчислюються результати визначення?

РОБОТА 12.20. ВИЗНАЧЕННЯ СУМИ ФЛАВОНОЇДІВ В ЛИСТІ РОСЛИН

Принцип методу. Флавоноїди екстрагують із рослинного матеріалу етанолом. Віст визначають за оптичною густиною спиртового розчину флавоноїдів у присутності хлориду алюмінію на спектрофотометрі.

Перебіг аналізу. 0,5 г (наважку беруть із похибкою $\pm 0,0002$ г) подрібненого рослинного матеріалу примішують у круглодонну колбу ємністю 150 мл, додають 50 мл 50 % етанолу, колбу приєднують до зворотного холодильника та занурюють у киплячу водяну баню. Суміш кип'ятять протягом 30 хв, періодично змиваючи частки рослин зі стінок колби за допомогою струшування суміші. Після цього суміш фільтрують через скляний фільтр № 3 у мірчу колбу об'ємом 100 мл. Операцію екстракції повторюють ще один раз із 45 мл 50 % етанолу, отриманий екстракт фільтрують у ту саму мірчу колбу. Після охолодження екстракту його об'єм доводять 50 % етанолом до мітки та перемішують.

2,5 мл отриманого екстракту переносять у мірчу колбу об'ємом 25 мл, додають 2 мл 2 % розчину хлориду алюмінію та доводять об'єм розчину 95 % етанолом до мітки; через 30 хв вимірюють оптичну густину розчину на спектрофотометрі за довжини хвилі 407 нм у кюветі з оптичним шляхом 10 мм. Як розчин порівняння використовують розчин, який складається з 2,5 мл екстракту, 1 мл 3 % розчину оцтової кислоти та 95 % етанолу, яким доводять об'єм розчину до 25 мл.

Вміст суми флавоноїдів у перерахунку на абсолютно суху речовину розраховують за формулою:

$$X = \frac{D \times 100 \times 100 \times 100 \times K}{n \times 330 \times 2,5 \times 4 \times (100 - b)} = \frac{D \times 1000 \times K}{n \times 330 \times (100 - b)},$$

де:

X – вміст суми флавоноїдів у рослинному матеріалі, %;

D – оптична густина дослідного розчину;

330 – питомий показник поглинання продукту взаємодії флавоноїдів із хлоридом алюмінію у 95 % етанолі за довжини хвилі 407 нм;

n – маса наважки, г;

b – втрата маси рослинного матеріалу під час висушування, %;

K – поправка спектрофотометра.

Паралельно із визначенням оптичної густини дослідного розчину вимірюють оптичну густину 0,004 % розчину біхромату калію на спектрофотометрі за довжини хвилі 350 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм. Для порівняння використовують 0,005 М розчин сірчаної кислоти. Поправку спектрофотометра обчислюють за формулою:

$$X = \frac{0,428}{D_1},$$

де:

0,428 – табличне значення оптичної густини 0,004 % розчину біхромату калію за 350 нм;

D_1 – виміряна оптична густина розчину біхромату калію.

Обладнання

1) аналітичні терези; 2) сита з діаметром отворів 1 мм; 3) водяна баня; 4) круглодонні колби ємністю 150 мл зі зворотним холодильником; 5) мірчі колби об'ємом 25 та 100 мл; 6) Фільтри Шотта № 3; 7) беззольні фільтри; 8) мірчі циліндри об'ємом 50 мл; 9) піпетки на 2 та 5 мл.

Реактиви

1) етанол 95 % розчин (ректифікат); 2) етанол 50 % розчин; 3) хлорид алюмінію (AlCl_3) 2 % розчин; 4) оцтова кислота (CH_3COOH) 3 % розчин; 5) сірчана кислота (H_2SO_4) 0,005 М розчин; 6) біхромат калію ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) 0,004 % розчин.

Приготування реактивів

Реактив № 3 (2 % розчин хлориду алюмінію (AlCl_3)). 2 г хлориду алюмінію (х. ч. або ч. д. а.) розчиняють у 50 мл 95 % етанолу, фільтрують у мірчу колбу об'ємом 100 мл та доводять об'єм розчину 95 % етанолом до мітки.

Реактив № 5 (0,005 М розчин сірчаної кислоти (H_2SO_4)). 0,3 мл сірчаної кислоти обережно додають у воду у мірчій колбі об'ємом 1 л, перемішують та доводять об'єм розчину водою до мітки.

Реактив № 6 (0,004 % розчин біхромату калію ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$)). 0,0400 г (з похибкою $\pm 0,0002$ г) біхромату калію, висушеного за 102,5 °С до постійної маси, розчиняють у 0,005 М розчині сірчаної кислоти у мірчій колбі об'ємом 1 л та доводять об'єм розчину до мітки розчином сірчаної кислоти.

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАТЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Охарактеризуйте хімічну будову та властивості флавоноїдів. Наведіть їх значення для рослин.
2. Наведіть характеристику принципу методу. Охарактеризуйте метод фотометрії.
3. Як проводиться аналіз?
4. Як обчислюються результати визначення?
5. Для чого обчислюється поправка спектрофотометра?

РОБОТА 12.21. ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ СУМИ ФЛАВОНОЛІВ У ЛИСТІ РОСЛИН

Принцип методу. Суму флавонолів визначають у присутності хлориду алюмінію спектрофотометричним методом.

Перебіг аналізу. 1 г подрібненого та просіяного через сито з діаметром отворів 1 мм рослинного матеріалу, зваженого з похибкою не більше 0,0002 г, поміщують у плоскодонну колбу ємністю 150–250 мл, додають 100 мл 30 % етанолу. Колбу приєднують до водяного холодильника та нагрівають на киплячій бані протягом 30 хв, періодично змиваючи частки матеріалу зі стінок колби. Далі суміш залишають на 10–15 хв і фільтрують через фільтр Шотта № 3 в мірчу колбу об'ємом 200 мл. Вилучення флавонолів повторюють ще раз. Після охолодження об'єм отриманого екстракту доводять 30 % етанолом до 200 мл. 2 мл екстракту приміщують у мірчу колбу об'ємом 25 мл, додають 2 мл 2 % водного розчину хлориду алюмінію та доводять об'єм розчину дистильованою водою до мітки. Через 30–40 хв вимірюють оптичну густину розчину на спектрофотометрі за довжини хвилі 415 нм у кюветі з оптичним шляхом 10 мм. Для порівняння застосовують розчин, що складається з 2 мл екстракту та 1 мл 3 % розчину оцтової кислоти, об'єм якого доводять у мірчій колбі до 25 мл 30 % етанолом.

Масову частку суми флавонолів розраховують за формулою:

$$X = \frac{D \times 250 \times 100}{380 \times n \times (100 - b)},$$

де:

X – вміст флавонолів у рослинному матеріалі, %;

D – оптична густина дослідного розчину;

380 – питоме поглинання світла продукту взаємодії флавонолів із хлоридом алюмінію у дистильованій воді за довжини хвилі 415 нм;

n – маса наважки рослинного матеріалу, г;

b – вологість рослинного матеріалу, %.

Обладнання

1) аналітичні терези; 2) сита з діаметром отворів 1 мм; 3) плоскодонні колби ємністю 150–250 мл; 4) мірчі колби об'ємом 200 мл; 5) мірчі колби об'ємом 25 мл; 6) піпетки на 2 мл; 7) спектрофотометр.

Реактиви

1) етанол (C_2H_5OH) 30 % розчин; 2) хлорид алюмінію ($AlCl_3$) 2 % розчин; 3) оцтова кислота (CH_3COOH) 3 % розчин.

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАТЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Охарактеризуйте флавоноли. Хімічна природа, значення для рослин.
2. Наведіть характеристику принципу методу. Охарактеризуйте метод фотометрії.
3. Як проводиться аналіз?
4. Як обчислюються результати визначення?

РОБОТА 12.22. ВИЗНАЧЕННЯ СУМИ ТАНІНІВ У ЛИСТІ РОСЛИН

За своєю хімічною структурою дубильні речовини, що гідролізуються, належать до полієфірів фенолкарбонових кислот та цукрів (або циклічних сполук, наприклад, хінної кислоти). Характерною особливістю є їх гідроліз під час нагрівання з розбавленими неорганічними кислотами, що відрізняє їх від конденсованих дубильних речовин, які під впливом кислот ще більше ущільнюються та утворюють нерозчинні аморфні сполуки. Залежно від будови утворюваних під час повного гідролізу первинних фенольних сполук розрізняють галові та елагові речовини. У обох групах нефенольним компонентом є моноцукри, зазвичай глюкоза.

Принцип методу. Таніни екстрагують етанолом із наступним осадженням оцтовою кислотою. Розчин нейтралізують і у присутності ксиленолового оранжевого титрують 0,01 М розчином трилону Б. За кількістю трилону Б визначають вміст танінів.

Перебіг аналізу. $1 \pm 0,0002$ г подрібненого до розміру часток 1 мм рослинного матеріалу примішують у колбу Ерленмеєра ємністю 250 мл, додають 100 мл 30 % етанолу. Колбу приєднують до зворотного водяного холодильника та нагрівають на киплячій бані протягом 30 хв, періодично змиваючи частки рослинного матеріалу зі стінок колби. Суміш залишають на 10–15 хв та фільтрують через фільтр Шотта № 2 у мірчу колбу об'ємом 200 мл. Екстракцію повторюють ще раз. Після охолодження доводять об'єм екстракт 30 % етанолом до мітки.

Беруть 10 мл екстракту, примішують у пробірку для центрифугування ємністю 25–50 мл, додають 10 мл реактиву осадження, суміш перемішують скляною паличкою, промиваючи її 5 мл дистильованої води. Через 30 хв суміш центрифугують протягом 5–10 хв за 5–6 тис. об./хв, надосадову рідину зливають, а до осаду у пробірці додають 20 мл 0,25 % розчину аміаку та перемішують тією самою паличкою, яку надалі промивають 5 мл розчином аміаку. Отриману суміш центрифугують і промивну рідину відкидають. Осад у пробірці розчиняють у 3 мл 30 % розчину оцтової кислоти. Розчин кількісно переносять у колбу ємністю 250 мл з допомогою 80–100 мл дистильованої води, рідину нейтралізують 25 мл 5 % розчину гідрокарбонату натрію, додають 0,5 мл розчину ксиленолового оранжевого та титрують 0,01 М розчином трилону Б до переходу червоно-фіолетового забарвлення розчину у жовте.

Вміст таніну обчислюють за формулою:

$$X = \frac{V \times K \times 0,00130 \times 200 \times 100}{n \times 10 \times (100 - b)},$$

де:

X – вміст танінів у перерахунку на абсолютно сухий рослинний матеріал, %;

V – кількість розчину трилону Б, витрачена на титрування дослідного зразка, мл;

K – поправка до титру 0,01 М розчину трилону Б;

0,00130 – відповідність 1 мл 0,01 М розчину трилону Б вмісту танінів, г;

n – наважка рослинного матеріалу, г;

b – вологість рослинного матеріалу, %.

Обладнання

1) аналітичні терези; 2) центрифуга; 3) сито, 4) зворотні холодильники; 5) колби Ерленмеєра ємністю 150, 250 та 500 мл, 6) палички скляні; 7) мірчі колби об'ємом 200 мл; 8) фільтр Шотта № 2.

Реактиви

1) етанол (C_2H_5OH) 30 % розчин; 2) реактив осадження; 3) аміак (NH_4OH) 0,25 % розчин; 4) оцтова кислота (CH_3COOH) 30 % розчин; 5) гідрокарбонат натрію ($NaHCO_3$) 5 % розчин; 6) ксиленоловий оранжевий ($C_{31}H_{28}N_2Na_4O_{13}S$) 0,5 % розчин; 7) трилон Б (ЕДТА, $C_{10}H_{18}N_2Na_2O_8$) 0,01 М розчин; 8) дистильована вода.

Приготування реактивів

Реактив № 2 (реактив осадження). 1 г оксиду цинку, зваженого з точністю до 0,01 г, приміщують у мірчу колбу об'ємом 100 мл, розчиняють у суміші 10 мл 25 % аміаку з 2,5 г хлориду амонію та доводять об'єм розчину дистильованою водою до мітки.

Реактив № 7 (0,01 М розчин трилону Б). 3,9 г трилону Б, зваженого з точністю 0,01 г, розчиняють у 250 мл дистильованої води, фільтрують у мірчу колбу об'ємом 1 л, доводять об'єм розчину дистильованою водою до мітки. Титр отриманого розчину трилону Б установлюють за розчином цинку.

Для встановлення титру розчину трилону Б готують 0,01 М розчин цинку: для цього 0,3 г металевого цинку, зваженого з точністю до 0,0002 г, розчиняють у 5 мл 16 % розчину сірчаної кислоти у мірчій колбі об'ємом 500 мл і після повного розчинення доводять об'єм розчину дистильованою водою до мітки.

Далі відбирають за допомогою мікробюретки 5 мл отриманого 0,01 М розчину цинку в колбу ємністю 150–250 мл, яка містить 100 мл дистильованої води, додають 0,5 мл розчину ксиленолового оранжевого та нейтралізують 5 % розчином гідрокарбонату натрію, додаючи його краплями, до появи червоно-фіолетового забарвлення. Далі додають 10 мл ацетатного буферного розчину та титрують із мікробюретки на 5 мл 0,01 М розчином трилону Б до переходу забарвлення розчину у жовте. Поправочний коефіцієнт обчислюють за формулою:

$$K = \frac{5 \times m}{0,0006538 \times 500 \times V'}$$

де:

K – титр розчину трилону Б;

m – маса наважки цинку, г;

V – об'єм 0,01 М розчину цинку, витрачений на титрування розчину цинку, мл.

Для додавання у реакційну суміш ацетатний буферний розчин (рН 5,5) 60 г ацетату натрію розчиняють у 250 мл дистильованої води, додають 10 мл 30 % розчину оцтової кислоти та доводять об'єм розчину дистильованою водою до 1 л.

Перевірка дистильованої води. У досліді слід застосовувати дистильовану воду певної якості. Для перевірки її до 100 мл води додають 10 мл ацетатного буферного розчину та 0,5 мл розчину ксиленолового оранжевого. Забарвлення розчину повинно бути жовтим. Якщо вода не відповідає цьому тесту, її потрібно піддати повторній дистиляції.

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Охарактеризуйте таніни. Їх хімічна будова та властивості, значення для рослин.
2. Наведіть основні групи дубильних речовин. Чим відрізняються дубильні речовини, що гідролізуються?
3. Наведіть характеристику принципу методу.
4. Як проводиться аналіз? Як оцінюється титр розчину трилону Б?
5. Як обчислюються результати визначення?

РОБОТА 12.23. ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ДУБІЛЬНИХ РЕЧОВИН

Дубильні речовини накопичуються у різних частинах рослин, однак найчастіше вони містяться у корі стовбура, коренів та кореневищ. Менше їх у стеблах та листках трав'янистих рослин, у оболонці плодів, деревині, крім деревини дубу та квербахо. Дубильні речовини, як і інші фенольні сполуки, локалізовані всередині рослинної клітини, більша їх частина зосереджена у вакуолях у розчиненому стані. Дубильні речовини легко вилучаються водою та водно-спиртовими сумішами.

Принцип методу. Дубильні речовини екстрагують гарячою водою та у присутності індігосульфокислоти титрують 0,1 N розчином KMnO_4 .

Перебіг аналізу. 2 г подрібненого рослинного матеріалу приміщують у конічну колбу об'ємом 500 мл, заливають 250 мл нагрітої до кипіння води і нагрівають зі зворотним холодильником на киплячій водяній бані протягом 30 хв. Рідину охолоджують до кімнатної температури та декантують приблизно 100 мл у конічну колбу через вату, слідкуючи за тим, щоб частки рослин не потрапили в колбу. Далі відбирають піпеткою 25 мл отриманого розчину у іншу конічну колбу або склянку ємністю 750 мл, додають 500 мл води, 25 мл індігосульфокислоти і титрують за умови постійного перемішування 0,1 N розчином KMnO_4 до золотисто-жовтого забарвлення, порівнюючи його з забарвленням розчину контрольної проби.

Для проведення контрольного визначення в конічну колбу або склянку ємністю 750 мл наливають 525 мл дистильованої води, додають 25 мл розчину індігосульфокислоти та титрують за умови постійного перемішування 0,1 N розчином KMnO_4 до золотисто-жовтого забарвлення.

Вміст дубильних речовин обчислюють за формулою:

$$X = \frac{(V - V_1) \times 0,004157 \times 250 \times 100}{n \times 25 \times (100 - b)},$$

де:

X – вміст дубильних речовин у рослинному матеріалі у перерахунку на абсолютно суху речовину, %;

V – об'єм 0,1 N розчину KMnO_4 , витрачений на титрування дослідного зразка, мл;

V_1 – об'єм 0,1 N розчину KMnO_4 , витраченого на титрування контрольного зразка, мл;

0,004157 – кількість дубильних речовин, що відповідає 1 мл 0,1 N розчину KMnO_4 , г;

n – маса наважки рослинного матеріалу, г;

b – вологість рослинного матеріалу, %;

250 – загальний об'єм екстракту, мл;

25 – об'єм екстракту, взятого для титрування, мл.

Обладнання

1) аналітичні терези; 2) конічні колби ємністю 500–750 мл; 3) водяна баня; 4) бюретки на 25–50 мл; 5) піпетки на 2, 20 та 25 мл; 6) медична вата.

Реактиви

1) перманганат калію (KMnO_4) 0,1 N розчин; 2) індіго-сульфокислота 1 % розчин.

Приготування реактивів

Реактив № 1 (0,1 N розчин перманганату калію (KMnO_4)). 3,3 г перманганату калію розчиняють у 1 л дистильованої води та кип'ятять протягом 10 хв. Колбу закривають пробкою, залишають на 2 доби в темному місці, далі фільтрують через фільтр Шотта. Зберігають у пляшці з темного скла у захищеному від світла місці.

Для визначення титру перманганату калію точно відміряють із бюретки 25 мл приготованого розчину у склянку з притертою пробкою, яка містить 20 мл розчину йодиду калію. Підкислюють 2 мл розведеної H_2SO_4 , закривають пробкою, змоченою розчином йодиду калію, та залишають на 10 хв у темному місці. До розчину додають 200 мл води, змиваючи пробку водою, і йод, що виділився, титрують 0,1 N розчином тіосульфату натрію до знебарвлення у присутності крохмалю.

Поправочний коефіцієнт розраховують за формулою:

$$K = \frac{V_0 \times K_0}{V},$$

де:

V_0 – об'єм розчину тіосульфату натрію, витрачений на титрування, мл;

V – об'єм розчину KMnO_4 , взятого для встановлення титру, мл;

K_0 – поправочний коефіцієнт розчину тіосульфату натрію.

Для приготування розведеної H_2SO_4 до 5 частин за об'ємом H_2O обережно додають 1 частину концентрованої H_2SO_4 .

Розчин йодиду калію готують у такий спосіб: 10 г реактиву розчиняють у 60 мл свіжої кип'яченої та охолодженої дистильованої води, загальний об'єм розчину доводять до 100 мл. Розчин повинен бути безбарвним. Зберігати його потрібно у пляшці з темного скла з притертою пробкою у захищеному від світла місці.

Для приготування 0,1 N розчину тіосульфату натрію 26 г реактиву та 0,1 г карбонату натрію розчиняють у дистильованій воді, що не містить діоксиду вуглецю. Об'єм розчину доводять цією самою водою до 1 000 мл. Розчин відстоюють 10 діб у захищеному від світла місці. За наявності осаду рідину фільтрують. Титр розчину тіосульфату натрію встановлюють за біхроматом калію. 0,15 г перекристалізованого з гарячої води та висушеного за 130–150 °C до постійної маси дрібно розтертого реактиву зважують із точністю до 0,0002 г, розчиняють у 50 мл H_2O у склянці з притертою пробкою, додають 2 г йодиду калію, розчиненого у 10 мл води, 5 мл HCl , закривають пробкою, змоченою розчином йодиду калію, та залишають у темному місці на 10 хв. Додають 200 мл води, змиваючи пробку, та титрують приготованим розчином тіосульфату натрію до зеленувато-жовтого забарвлення. Далі додають 2–3 мл розчину крохмалю і продовжують титрування до переходу синього забарвлення у світло-зелене.

Поправочний коефіцієнт:

$$K_0 = \frac{a}{0,004904 \times V},$$

де:

K_0 – поправочний коефіцієнт;

0,004904 – кількість біхромату калію, що міститься в 1 мл 0,1 N розчину, г;

a – наважка біхромату калію, г;

V – об'єм розчину тіосульфату натрію, витрачений на титрування, мл.

Реактив № 2 (розчин індиго-сульфокислоти). 1 г індигокарміну розчиняють у 25 мл концентрованої H_2SO_4 , далі додають ще 25 мл концентрованої H_2SO_4 та розбавляють дистильованою водою до 1 000 мл, обережно доливаючи розчин у воду.

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Охарактеризуйте речовини, що підлягають визначенню. Хімічна природа, значення для рослин.
2. Наведіть основні групи дубильних речовин.
3. Наведіть характеристику принципу методу. Охарактеризуйте метод фотометрії.
4. Як проводиться аналіз?
5. Як обчислюються результати визначення?

РОБОТА 12.24. ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ КОФЕЇНУ У РОСЛИННОМУ МАТЕРІАЛІ

Принцип методу. Метод оснований на швидкому вилученні кофеїну хлороформом із попередньо нагрітого і обробленого водним аміаком подрібненого рослинного матеріалу.

Перебіг аналізу. 2,5 г попередньо подрібненого рослинного матеріалу, зваженого з похибкою не більше 0,0002 г, приміщують у колбу ємністю 250 мл, додають 6 г кварцового піску і перемішують. Одночасно визначають вологість рослинного матеріалу. Колбу з наважкою подрібненого матеріалу ставлять у киплячу водяну баню на 2 хв, далі додають 10–15 мл 25 % розчину аміаку до повного змочування наважки. Через 5 хв додають 90 мл хлороформу і кип'ятять зі зворотним холодильником протягом 15 хв. Після закінчення нагрівання колбу охолоджують до кімнатної температури і фільтрують її вміст через вату в колбу ємністю 250 мл, що містить 0,6 г алюмокалієвих квасців у порошок і 2 г вазеліну. Матеріал, що залишився після екстракції, промивають сім разів, використовуючи для цього 30 мл хлороформу, після чого хлороформ зливають у колбу, що містить квасці та вазелін.

Знебарвлену рідину фільтрують через змочену водою вату в ділильну лійку ємністю 250 мл, колбу промивають три рази водою по 10 мл, яку зливають через ту саму вату, додаючи у ділильну лійку. До зібраної в ділильній лійці рідини додають 3 мл 25 % розчину гідроксиду калію, 10–15 крапель 2 % розчину перманганату калію, 30 мл хлороформу і збовтують протягом 3 хв (у разі утворення емульсії збільшують кількість хлороформу).

Хлороформ зливають через змочений цим самим розчином фільтр у колбу. Збовтування рідини в ділильній воронці повторюють ще три рази, додаючи щоразу по 20 мл хлороформу. Хлороформ відганяють, залишок у колбі розчиняють у 5 мл 10 % розчину сірчаної кислоти і фільтрують через маленький паперовий фільтр у мірчу колбу об'ємом 50 мл.

Колбу із залишком кофеїну промивають ще три рази по 5 мл 10 % розчину сірчаної кислоти, зливаючи розчин через той самий фільтр в і ту саму колбу.

Далі у колбу додають 25 мл 0,1 N розчину йоду, вміст колби доливають до мітки дистильованою водою за температури 20 °С, добре перемішують і залишають у прохолодному місці на 20–30 хв до повного осадження періодиту.

Йодний розчин обережно фільтрують через невеликий шматочок вати в суху колбу місткістю 100 мл, причому перші порції фільтрату відкидають, оскільки фільтрат повинен бути прозорим. Відбирають піпеткою 25 мл фільтрату і титрують 0,1 N розчином тіосульфату натрію.

Вміст кофеїну обчислюють за формулою:

$$X = \frac{(V - 2 \times V_1) \times 0,00485 \times 100}{n},$$

де:

X – вміст кофеїну у рослинному матеріалі, %;

V – кількість 0,1 N розчину йоду, взятого для визначення, мл;

V_1 – кількість 0,1 N розчину тіосульфату натрію, витраченого на титрування надлишку йоду, мл;

$0,00485$ – кількість кофеїну, що відповідає 1 мл 0,1 N розчину йоду, г;

n – маса наважки абсолютно сухого рослинного матеріалу, г.

За результат аналізу приймають середнє арифметичне значення двох паралельних визначень, розбіжність між якими не повинна перевищувати 0,5 %.

Обладнання

- 1) колби Ерленмеєра ємністю 250 та 100 мл; 2) зворотний холодильник;
- 3) ділільні лійки ємністю 250 мл; 4) мірчі піпетки на 25 мл; 5) бюретки на 30 мл;
- 6) кварцовий пісок; 7) медична вата.

Реактиви

- 1) аміак (NH_4OH) 25 % розчин; 2) алюмокалієві квасці ($\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$);
- 3) хлороформ (CHCl_3); 4) вазелін; 5) перманганат калію (KMnO_4) 2 % розчин;
- 6) йод (I_2) 0,1 N розчин (готується з фіксаналу); 7) тіосульфат натрію ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 0,1 N розчин (готується з фіксаналу).

ПИТАННЯ ДЛЯ КОНТРОЛЮ ЗНАЬ ТА САМОПІДГОТОВКИ

1. Охарактеризуйте речовини, що підлягають визначенню. Хімічна природа, значення для рослин, дія на людину.
2. Наведіть характеристику принципу методу. Охарактеризуйте метод редокс-титрування.
3. Як проводиться аналіз?
4. Як обчислюються результати визначення?

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Александрова К. В., Шкода О. С., Крісанова Н. В. та ін. Ферменти: методичний посібник для викладачів. Запоріжжя: ЗДМУ, 2015. 115 с.
2. Анисимов А. А., Доброгина Н. А., Чадаева Н. И. и др. Методы белковой химии: учеб. пособ. Горький: Изд-во Горьковского ун-та, 1977. 134 с.
3. Бойко М. И., Негруцкая Г. М., Синельщикова З. И. Лабораторные занятия по большому практикуму (для студентов дневного и заочного отделения специальности «Физиология растений»). Донецк: ДонГУ, 1981. 56 с.
4. Бойко М. І., Приседський Ю. Г. Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт з теми «Вуглеводний обмін рослин» спецкурсу «Великий практикум». Донецьк: ДонДУ, 1999. 28 с.
5. Бойко М. І., Приседський Ю. Г., Ветрова О. В. Великий практикум з фізіології та біохімії рослин (білки, ферменти, вітаміни, нуклеїнові кислоти): методичні вказівки. Донецьк: ДонНУ, 2012. 107 с.
6. Бойко С. М., Приседський Ю. Г. Методичні вказівки з курсу «Молекулярні та цитогенетичні основи розвитку організмів» до виконання лабораторних робіт з теми «Біохімічні маркери». Вінниця, 2021. 40 с.
7. Бойко М. І., Приседський Ю. Г. Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт з теми «Білковий обмін, ферменти, нуклеїнові кислоти і вітаміни» спецкурсу «Великий практикум». Донецьк: ДонДУ, 1999. 90 с.
8. Болотов В. В., Євтіфєєва О. А., Жукова Т. В., Клименко Л. Ю., Микитенко О. Є., Мороз В. П., Петухова І. Ю. Аналітична хімія: навч.-довідк. посіб. для студ. вищ. навч. закл. Харків: НФаУ, 2014. 320 с.
9. Бронувицкая З. С., Горстов В. П. Высаливание белков сернокислым аммонием при низких температурах. Прикладная биохимия и микробиология, 1976. Т. 3, вып. 6. С. 64.
10. Володимирець В. О. Біохімія рослин: інтерактивний комплекс навчально-методичного забезпечення. Рівне: НУВГП, 2006. 127 с.
11. ДСТУ 4569:2006 Жири тваринні і рослинні та олії. Методи визначання йодного числа. 27.04.2006.
12. Ермаков А. И. Арасимович В. В., Смирнова-Иконникова М. И. и др. Методы биохимического исследования растений. Ленинград: Колос, 1972. 456 с.
13. Зайцева Г. Н., Тюленева Н. П. Количественное определение аминокислот на хроматограммах посредством образования медных производных с нингидрином. *Лабораторное дело*. 1958, № 3. С. 126.
14. Крамаренко В. Ф. Токсикологическая химия. Киев: Вища шк., 1989. 447 с.
15. Красильникова Л. А., Авксентьева О. А., Жмурко В. В., Садовниченко Ю. А. Биохимия растений. Харьков: Торсинг, 2004. 224 с.

16. Ленинжер А. Биохимия. Москва: Мир, 1976. 957 с.
17. Масленко С. Н., Величко В. В., Великонська Н. М., Перескока В. В. Аналітична хімія і методи аналізу: навч. посібник. Дніпропетровськ: НМетАУ, 2011. 162 с.
18. Маурер Г. Диск-электрофорез. Москва: Мир, 1971. 242 с.
19. Мусієнко М. М., Паршикова Т. В. Славний П. С. Спектрофотометричні методи в практиці фізіології, біохімії та екології рослин. Київ: Фітосоціоцентр, 2001. 200 с.
20. Паршикова Т. В., Войцехівська О. В., Капустян А. В., Косик О. І. та ін. Фізіологія рослин: практикум. Луцьк: Терен, 2010. 404 с.
21. Пасхина Т. С. Количественное определение аминокислот при помощи хроматографии на бумаге. *Современные методы биохимии*. Москва: Медицина, 1964. 257 с.
22. Плешков Б. П. Практикум по биохимии растений. Москва: Колос, 1968. 182 с.
23. Починок Х. Н. Методы биохимического анализа растений. Киев: Наукова думка, 1976. 382 с.
24. Прилуцька С. В., Демчук Т. Л., Бойко О. А., Коломієць Ю. В. Біохімія. Навчально-методичні рекомендації до виконання лабораторних занять та самостійної роботи студентами ОКР «Бакалавр» напрямку підготовки 0514 «Біотехнологія» зі спеціальності 6.051401 – «Біотехнологія» в аграрних вищих навчальних закладах III–IV рівнів акредитації. Київ: НУБіП, 2012. 41 с.
25. Приседський Ю. Г. Методичний посібник для самостійної роботи із спецкурсу «Великий практикум». Донецьк: Норд-Комп'ютер, 2004. 67 с.
26. Приседський Ю. Г. Фотосинтез. Методичний посібник з виконання лабораторних робіт та самостійної роботи. Вінниця: ДонНУ, 2016. 76 с.
27. Приседський Ю. Г., Решетник К. С. Методичні рекомендації до виконання лабораторних робіт з курсу «Фізіологія та біохімія рослин». Вінниця: ДонНУ ім. Василя Стуса, 2018. 57 с.
28. Рубин Б. А., Чернаюша И. А., Потапов Н. Г., Косулина Л. Г., Кренделева Т. Е. Большой практикум по физиологии растений. Минеральное питание. Физиология клетки. Рост и развитие: учеб. пособие для студентов биол. спец. вузов. Москва: Высшая школа, 1978. 408 с.
29. Сафонов В. И., Сафонова М. П. Исследование белков и ферментов растений методом электрофореза в полиакриламидном геле. *Биохимические методы в физиологии растений*. Москва: Наука, 1971. 227 с.
30. Специальный практикум по биохимии и физиологии растений / под ред. проф. М. И. Окунцова. Томск: Изд-во Томского ун-та, 1974. 144 с.
31. Спосіб визначення вмісту редуруючих цукрів у рослинному матеріалі: патент України на корисну модель № 121789. Ю. Г. Приседський, Л. В. Ніцен-

ко. Заявка U 2017 07737 від 21.07.2017 кл. A01G7/00, Бюл. № 23/2017 від 11.12.2017.

32. Спосіб визначення каталазної активності базидіоміцетів: патент 39243 А України. О. В. Федотов, Г. В. Гавриленко. Заявка № 2000116560 від 21.11.00, кл. 7C12N9/58, Бюл. № 5 від 15.06.01.

33. Спосіб одержання ферментного препарату пероксидази *Flammulina velutipes* (Curt.: Fr.) Sing.: Патент 8739 України. О. В. Федотов, О. Ю. Кваско. Заявка № 200501510 від 18.02.2005, кл. 7C12N9/58, Бюл. № 8 від 15.08.05.

34. Стороженко В. О., Таран Н. Ю., Мусієнко М. М. Виділення хлоропластів і субхлоропластних фракцій. Київ: Анна-Т, 2008. 33 с.

35. Трувеллер К. А., Нефедов Г. И. Многоцелевой прибор для вертикального электрофореза в параллельных пластинах полиакриламидного геля. *Научные доклады высшей школы. Биол. науки.* 1974, № 9. С. 137–140.

36. Уильямс У. Дж. Определение анионов: справочник. Москва: Химия, 1982. 624 с.

37. Федущак Н. К., Бідниченко Ю. І., Крамаренко С. Ю., Калібабчук В. О. та ін. Аналітична хімія: підручник для студентів напряму «Фармація» і «Біотехнологія» вищих навчальних закладів. Вінниця: Нова Книга, 2012. 640 с.

38. Филиппович Ю. Б. Егорова Т. А., Севастьянова Г. А. Практикум по общей химии. Москва: Просвещение, 1975. 318 с.

39. Jacobson J., Heller L. Y. Selective Ion electrode analysis of fluoride in vegetation. *Proceedings of the Sec. Int. Clean Air Congress.* New York; London. 1971. P. 459–462.

40. Технологія оздоровчих напоїв та фітоконцентратів: лабораторний практикум для студ. освітнього ступеня «Магістр» спец. 181 «Харчові технології» спеціалізації «Технології харчових продуктів оздоровчого та профілактичного призначення» ден. та заоч. форм навчання / уклад. Н. О. Степенко, Г. О. Сімахіна, І. Л. Ясінська, О. М. Соколова. Київ: НУХТ, 2017. 126 с. URL: <https://kzref.org/praktikum-dlya-studentiv-osvitneogo-stupenya-magistr-specialen.html?page=4>

41. Визначення – число – омилення. *Технічна енциклопедія TechTrend.* URL: <http://techtrend.com.ua/index.php?newsid=19389>

ДОДАТОК А

АТОМНІ ТА МОЛЕКУЛЯРНІ МАСИ

Таблиця 1д

Атомні маси деяких елементів

Символ елемента	Назва елемента	Порядковий номер елемента	Атомна маса елемента
Ag	Срібло	89	107,868
Al	Алюміній	13	26,9815
As	Миш'як, арсен	33	74,9216
B	Бор	5	10,811
Ba	Барій	56	137,34
Bi	Вісмут, бісмут	83	208,980
Br	Бром	35	79,904
C	Вуглець	6	12,01115
Ca	Кальцій	20	40,08
Cd	Кадмій	48	112,40
Cl	Хлор	17	35,453
Co	Кобальт	27	58,9332
Cr	Хром	24	51,996
Cu	Мідь	29	63,546
F	Фтор	9	18,9984
Fe	Залізо	26	55,847
H	Водень	1	1,00797
He	Гелій	2	4,0026
Hg	Ртуть	80	200,59
I	Йод	53	126,9044
K	Калій	19	39,102 I
Li	Літій	3	6,939
Mg	Магній	12	24,305
Mn	Марганець	25	54,9380
Mo	Молібден	42	95,94
N	Азот	7	14,0067
Na	Натрій	11	22,9898
Ni	Нікель	28	58,71
O	Кисень	8	15,9994
P	Фосфор	15	30,9738
Pb	Свинець	82	207,19
S	Сірка	11	32,064
Si	Кремній, силіцій	14	28,086
Sn	Олово	50	118,69
W	Вольфрам	74	183,85
Zn	Цинк	30	65,37

Таблиця 2д

Молекулярні та еквівалентні маси деяких хімічних сполук

Формула	Молекулярна маса	Еквівалентна маса
AgNO ₃	169,873	169,873
AlCl ₃	133,341	44,447
AlCl ₃ ·6H ₂ O	241,433	80,478
AlNO ₃	212,996	70,999
AlNO ₃ ·9H ₂ O	375,134	125,045
Al ₂ (SO ₄) ₃	342,150	114,050
Al ₂ (SO ₄) ₃ ·18H ₂ O	666,420	222,140
BaCl ₂	208,250	104,125
BaCl ₂ ·2H ₂ O	244,280	122,140
Ba(OH) ₂	171,350	85,675
Ba(OH) ₂ ·8H ₂ O	315,48	157,74
C ₅ H ₅ N (<i>піридин</i>)	79,1023	
C ₆ H ₆ O (<i>фенол</i>)	94,1141	
CO (<i>оксид вуглецю</i>)	28,0106	
CO ₂ (<i>діоксид вуглецю</i>)	44,0100	
Ca(C ₂ H ₃ O ₂) ₂ (<i>ацетат, ацетат</i>)	158,170	79,085
Ca ₃ (C ₆ H ₅ O ₇) ₂ (<i>цитрат, лимоннокислий</i>)	498,450	166,150
CaC ₂ O ₄ (<i>оксалат, щавлевокислий</i>)	128,100	64,050
Ca ₂ C ₂ O ₄ ·H ₂ O	146,120	73,060
CaCl ₂	110,990	55,4950
CaCl ₂ ·6H ₂ O	219,080	109,540
CaHPO ₄	136,060	45,353
CaHPO ₄ ·2H ₂ O	172,090	57,363
Ca(H ₂ PO ₄) ₂	234,050	78,017
Ca(H ₂ PO ₄) ₂ ·H ₂ O	257,070	85,690
Ca(NO ₃) ₂	164,090	82,045
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	236,150	118,075
Ca(OH) ₂	74,090	37,045
Ca(PO ₃) ₂	198,020	99,010
Ca ₃ (PO ₄) ₂	310,180	103,393
CaSO ₃	120,140	60,070
CaSO ₃ ·2H ₂ O	156,170	78,0850
CaSO ₄	136,140	68,070
CaSO ₄ ·1/2H ₂ O	145,150	72,575
CaSO ₄ ·2H ₂ O	172,170	86,085
Cd(C ₂ H ₃ O ₂) ₂ (<i>ацетат, ацетат</i>)	230,490	115,245
CdCl ₂	183,310	91,655
CdCl ₂ ·H ₂ O	201,320	100,660
CdCl ₂ ·2,5H ₂ O	228,340	114,170
Cd(NO ₃) ₂	234,400	118,200
Cd(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	308,470	154,235
CdSO ₄	208,460	104,230
CdSO ₄ ·8/3H ₂ O	256,500	128,250
CuCl	98,999	98,999
CuCl ₂	134,452	67,226
CuCl ₂ ·2H ₂ O	170,483	85,241

Формула	Молекулярна маса	Еквівалентна маса
Cu(NO ₃) ₂	187,556	93,778
Cu(NO ₃) ₂ ·3H ₂ O	241,607	120,801
Cu(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	295,648	147,824
CuO	79,545	19,773
Cu(OH) ₂	97,561	48,781
Cu ₂ O	143,091	71,345
CuSO ₄	159,608	79,804
CuSO ₄ ·5H ₂ O	249,685	124,843
FeCl ₂	126,750	63,375
FeCl ₂ ·4H ₂ O	198,810	99,405
FeCl ₃	162,210	54,070
FeCl ₃ ·6H ₂ O	270,300	135,150
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ ·6H ₂ O (<i>сіль Мора</i>)	392,140	392,140 (овр)
Fe(NO ₃) ₃	241,862	80,621
Fe(NO ₃) ₃ ·6H ₂ O	349,950	116,650
Fe(OH) ₃	106,869	35,623
FePO ₄	150,818	50,273
FeSO ₄	151,910	75,846 (р. об.) 151,910 (овр)
FeSO ₄ ·7H ₂ O	278,020	139,010 (р. об.) 278,020 (овр)
Fe ₂ (SO ₄) ₃	399,880	133,290
Fe ₂ (SO ₄) ₃ ·9H ₂ O	562,020	187,340
HBr	80,912	80,912
HBrO	96,911	96,911
HbrO ₃	128,910	128,910
HCHO ₂ (<i>мурашина кислота</i>)	46,026	46,026
HC ₂ H ₃ O ₂ (<i>оцтова кислота</i>)	60,053	60,053
HC ₃ H ₅ O ₃ (<i>молочна кислота</i>)	90,079	90,079
H ₂ C ₄ H ₄ O ₄ (<i>буриштинова кислота</i>)	118,090	59,045
H ₂ C ₄ H ₄ O ₅ (<i>яблучна кислота</i>)	134,089	67,0445
H ₂ C ₄ H ₄ O ₆ (<i>винна кислота</i>)	150,890	75,445
H ₃ C ₆ H ₅ O ₇ (<i>лимонна кислота</i>)	192,126	64,042
H ₃ C ₆ H ₅ O ₇ ·H ₂ O	210,142	70,0473
H ₂ C ₈ H ₄ O ₄ (<i>фталева кислота</i>)	166,135	83,0675
H ₂ CO ₃	62,025	31,013
HCO ₂	45,018	45,018
H ₂ C ₂ O ₄ (<i>щавлева кислота</i>)	90,036	45,018
HCl (<i>соляна кислота</i>)	36,461	36,461
HClO ₄ (<i>хлорна кислота</i>)	100,459	100,459
HF (<i>плавикова кислота</i>)	20,006	20,006 *
HI	127,912	127,912
HNO ₂ (<i>азотиста кислота</i>)	47,013	47,013
HNO ₃ (<i>азотна кислота</i>)	63,013	63,013
H ₂ O	18,015	
HPO ₃	79,980	79,980
H ₃ PO ₄	97,995	32,665
H ₂ SO ₄	98,078	49,039
HgCl ₂	271,500	135,750

Формула	Молекулярна маса	Еквівалентна маса
Hg ₂ Cl ₂	479,020	479,020
HgI ₂	454,400	227,200
KBr	119,006	119,006
KC ₂ H ₃ O ₂ (<i>ацетат, ацетат</i>)	98,147	98,147
K ₂ C ₄ H ₄ O ₆ ·1/2H ₂ O (<i>тартрат, виннокислий</i>)	235,285	117,643
K ₂ C ₆ H ₅ O ₇ ·H ₂ O (<i>цитрат, лимоннокислий</i>)	324,424	108,141
K ₂ CO ₃	138,213	69,107
K ₂ C ₂ O ₄ ·H ₂ O (<i>оксалат, щавлевокислий</i>)	184,239	92,119
KCl	74,555	74,555 I
KClO ₃	122,553	122,553
KClO ₄	138,553	138,553
K ₂ Cr ₂ O ₇	294,192	147,096(р. об.) 49,032 (овр)
KF	58,100	58,100
KHCO ₃	100,119	100,119
KH ₂ PO ₄	136,089	45,363
K ₂ HPO ₄	174,183	58,061
KHSO ₃	120,172	60,086
KHSO ₄	136,172	68,086
KI	166,006	166,006
KIO ₃	214,005	214,005 (р. об.) 35,667 (овр)
KMnO ₄	158,038	158,038 (р. об.) 31,6075 (овр)
KNO ₂ (<i>нітрит</i>)	85,108	85,108
KNO ₃ (<i>нітрат</i>)	101,107	101,107
KNaC ₄ H ₄ O ₆ ·4H ₂ O (<i>калій-натрій тартрат, сегнетова сіль</i>)	282,226	141,113
KOH	56,109	56,109
K ₃ HPO ₄	212,227	70,759
K ₂ SO ₃	158,266	79,133
K ₂ SO ₃ ·2H ₂ O	194,297	97,149
K ₂ SO ₄	174,266	87,133
K ₂ S ₂ O ₅	222,33	111,165
K ₂ S ₂ O ₇	254,33	127,165
K ₂ S ₂ O ₈	270,33	135,165
Li ₃ PO ₄	115,788	38,596
Li ₂ SO ₄	109,940	54,970
Li ₂ SO ₄ ·H ₂ O	127,955	63,978
MgCO ₃	84,314	42,157
MgCl ₂	95,211	47,606
MgCl ₂ ·6H ₂ O	203,303	101,652
Mg(NO ₃) ₂	148,315	74,158
Mg(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	256,407	128,204
Mg(OH) ₂	58,320	29,160
MgSO ₄	120,367	60,184
MgSO ₄ ·7H ₂ O	264,474	132,237
MnCO ₃	114,947	57,474
MnCl ₂	125,844	62,922

Формула	Молекулярна маса	Еквівалентна маса
MnCl ₂ ·4H ₂ O	197,905	98,953
Mh(NO ₃) ₂	178,948	89,474
Mn(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	287,040	143,520
MnSO ₄	151,000	75,500
MnSO ₄ ·4H ₂ O	223,061	111,531
MnSO ₄ ·5H ₂ O	241,076	120,538
MnSO ₄ ·7H ₂ O	277,107	138,554
NH ₃ C ₂ H ₃ O ₂ (<i>ацетат, ацетат</i>)	77,084	77,084
(NH ₄) ₂ CO ₃	96,086	48,043
(NH ₄) ₂ CO ₃ ·H ₂ O	114,102	57,051
(NH ₄) ₂ C ₂ O ₄ ·H ₂ O (<i>оксалат, щавлевокислий</i>)	142,112	71,056
NH ₄ Cl	53,492	53,492
NH ₄ F	37,037	37,037
NH ₄ H ₂ PO ₄	115,026	28,342
(NH ₄) ₂ HPO ₄	132,057	44,019
NH ₄ HSO ₄	115,108	57,554
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	1 235,900	
NH ₄ NO ₂ (<i>нітрит</i>)	64,0441	64,0441
NH ₄ NO ₃ (<i>нітрат</i>)	80,0435	80,0435
NH ₄ OH	35,046	35,046
(NH ₄) ₃ ·12Mo ₃	1 876,300	
(NH ₄) ₂ SO ₃	116,139	58,069
(NH ₄) ₂ SO ₄	132,139	66,069
Na ₂ B ₄ O ₇ (<i>буря</i>)	201,220	100,610
Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O	381,370	190,690
NaBr	102,894	102,894
NaBr·2H ₂ O	138,925	138,925
NaC ₂ H ₃ O ₂ (<i>ацетат, ацетат</i>)	82,0348	82,0348
NaC ₂ H ₃ O ₂ ·3H ₂ O	136,083	136,081
Na ₂ C ₄ H ₄ O ₆ ·2H ₂ O (<i>тартрат, виннокислий</i>)	230,083	115,041
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ ·5,5H ₂ O (<i>цитрат, лимоннокислий</i>)	357,156	319,052
Na ₂ C ₈ H ₄ O ₄ (<i>фталат</i>)	210,098	105,049
Na ₂ CO ₃	105,989	52,994
Na ₂ CO ₃ ·10H ₂ O	286,142	143,071
Na ₂ C ₂ O ₄ (<i>оксалат, щавлевокислий</i>)	134,000	67,000
NaCl	58,443	58,443
NaClO ₃	106,441	106,441
NaClO ₄	122,440	122,440
NaF	41,988	41,988
NaHCO ₃	84,007	42,004
NaHC ₂ O ₄	112,018	56,009
NaHC ₂ O ₄ ·H ₂ O	130,033	65,017
NaH ₂ PO ₄	119,997	39,999
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	156,008	156,008
Na ₂ HPO ₄	141,959	47,320
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	177,990	59,330
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	358,143	119,381
NaHSO ₃	104,060	52,030
NaHSO ₄	120,059	60,035

Формула	Молекулярна маса	Еквівалентна маса
NaI	149,8942	149,8942
NaIO ₃	197,8924	197,8924
NaIO ₄	213,892	213,892
Na ₂ MoO ₄	205,92	102,96
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	241,95	120,975
NaNO ₂	68,995	34,995 (р. об.) 34,995 (овр)
NaNO ₃	84,9947	84,9947
Na ₃ PO ₄	163,491	54,647
Na ₃ PO ₄ ·12H ₂ O	380,125	126,708
Na ₂ SO ₃	126,042	63,021
Na ₂ SO ₃ ·7H ₂ O	252,149	126,075
Na ₂ SO ₄	142,041	71,021
Na ₂ SO ₄ ·10H ₂ O	322,195	161,098
Na ₂ S ₂ O ₃	158,110	79,053 (р. об.) 158,110 (овр)
Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O	248,180	124,091 (р. об.) 248,110 (овр)
Na ₂ WO ₄	293,810	146,903
Na ₂ WO ₄ ·2H ₂ O	329,840	164,920
Ni(NO ₃) ₂	182,720	91,360
Ni(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	290,810	145,405
Pb(C ₂ H ₃ O ₂) ₂ (ацетат, ацетат)	325,280	162,640
Pb(C ₂ H ₃ O ₂) ₂ ·3H ₂ O	379,330	189,665
PbCl ₂	278,100	139,050
PbCl ₄	349,000	87,250
Pb(OH) ₂	241,200	120,600
PbSO ₄	303,250	151,625
SO ₂	64,063	
SO ₃	80,062	
SnCl ₂	189,600	94,800
SnCl ₂ ·2H ₂ O	225,630	112,815
SnCl ₄	260,500	62,125
Zn(C ₂ H ₃ O ₂) ₂ (ацетат, ацетат)	183,460	91,730
ZnCO ₃	125,380	62,690
ZnCl ₂	136,280	68,140
Zn(NO ₃) ₂	189,380	94,690
Zn(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	297,470	148,735
Zn(OH) ₂	99,380	49,690
ZnSO ₄	161,430	80,715
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	287,540	143,770

Примітка: для деяких речовин у таблиці наведено дві еквівалентні маси:

- для обмінних реакцій (р. об.);
- для окисно-відновних реакцій (овр).

Таблиця 3д

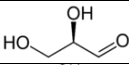
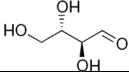
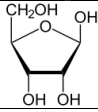
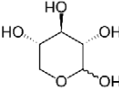
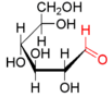
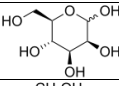
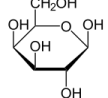
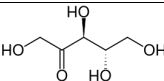
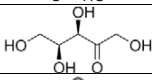
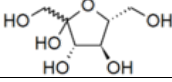
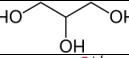
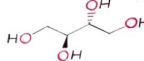
Молекулярні маси протейогенних амінокислот

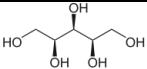
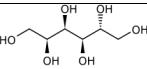
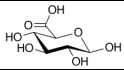
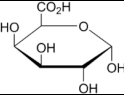
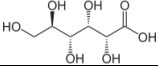
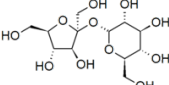
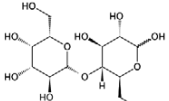
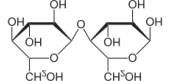
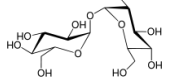
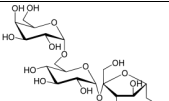
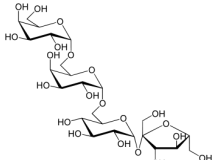
Назва	Формула	Молекулярна маса	Назва	Формула	Молекулярна маса
Аланін	$\text{H}_3\text{C}-\text{CH}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}_2$	89,10	Глутамін	$\text{O}=\text{C}-\underset{\text{H}_2\text{N}}{\text{C}}-\underset{\text{H}_2}{\text{C}}-\underset{\text{H}_2}{\text{C}}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}_2$	146,15
Аргінін	$\text{H}_2\text{N}-\underset{\text{H}}{\text{C}}-\underset{\text{H}}{\text{N}}-\underset{\text{H}}{\text{C}}-\underset{\text{H}_2}{\text{C}}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}_2$	174,20	Глутамінова кислота	$\text{O}=\text{C}-\underset{\text{HO}}{\text{C}}-\underset{\text{H}_2}{\text{C}}-\underset{\text{H}_2}{\text{C}}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}_2$	147,13
Аспарагін	$\text{O}=\text{C}-\underset{\text{H}_2\text{N}}{\text{C}}-\underset{\text{H}_2\text{N}}{\text{CH}}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}_2$	132,12	Ізолейцин	$\text{H}_2\text{C}-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\underset{\text{H}_2\text{N}}{\text{CH}}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}_2$	131,18
Аспарагінова кислота	$\text{O}=\text{C}-\underset{\text{HO}}{\text{C}}-\underset{\text{H}_2\text{N}}{\text{CH}}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}_2$	133,11	Лейцин	$\text{H}_3\text{C}-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\underset{\text{H}_2\text{N}}{\text{CH}}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}_2$	131,18
Валін	$\text{H}_3\text{C}-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\underset{\text{H}_2\text{N}}{\text{CH}}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}_2$	117,15	Лізин	$\text{H}_2\text{C}-\underset{\text{H}_2\text{N}}{\text{C}}-\underset{\text{H}_2}{\text{C}}-\underset{\text{H}_2}{\text{C}}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}_2$	146,19
Гістидин	$\text{HN}-\text{C}_4\text{H}_3-\underset{\text{H}_2}{\text{C}}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}_2$	155,16	Метіонін	$\text{S}-\underset{\text{CH}_3}{\text{C}}-\underset{\text{H}_2\text{N}}{\text{C}}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}_2$	149,21
Гліцин	$\text{H}-\underset{\text{H}_2\text{N}}{\text{CH}}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{OH}$	75,07	Пролін	$\text{H}-\text{N}-\text{C}_4\text{H}_7-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{OH}$	115,13
Серин	$\text{H}-\text{N}-\text{C}_4\text{H}_7-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{OH}$	105,09	Триптофан	$\text{HN}-\text{C}_6\text{H}_4-\underset{\text{H}_2}{\text{C}}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}_2$	204,23

Назва	Формула	Молекулярна маса	Назва	Формула	Молекулярна маса
Тирозин	$ \begin{array}{c} \text{HO} \\ \\ \text{C}_6\text{H}_4 \\ \\ \text{C} \begin{array}{l} \text{H}_2 \\ \end{array} - \text{CH} - \text{C} \begin{array}{l} \text{O} \\ \end{array} \text{OH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array} $	181,19	Фенілаланін	$ \begin{array}{c} \text{C}_6\text{H}_5 \\ \\ \text{C} \begin{array}{l} \text{H}_2 \\ \end{array} - \text{CH} - \text{C} \begin{array}{l} \text{O} \\ \end{array} \text{OH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array} $	165,19
Треонін	$ \begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} - \text{CH} - \text{CH} - \text{C} \begin{array}{l} \text{O} \\ \end{array} \text{OH} \\ \quad \\ \text{OH} \quad \text{NH}_2 \end{array} $	119,12	Цистеїн	$ \begin{array}{c} \text{H}_2\text{C} - \text{CH} - \text{C} \begin{array}{l} \text{O} \\ \end{array} \text{OH} \\ \quad \\ \text{SH} \quad \text{NH}_2 \end{array} $	121,16

Таблиця 40

Молекулярні маси деяких моно-, ди- та олігосахаридів

Назва	Формула		Молекулярна маса, г/моль
	Емпірична	Структурна	
Альдози			
Гліцеральдегід	C ₃ H ₆ O ₃		90,08
Еритроза	C ₄ H ₈ O ₄		20,1039
Рибоза	C ₅ H ₁₀ O ₅		150,13
Ксилоза	C ₅ H ₁₀ O ₅		150,13
Алоза	C ₆ H ₁₂ O ₆		180,156
Глюкоза	C ₆ H ₁₂ O ₆		180,156
Маноза	C ₆ H ₁₂ O ₆		180,156
Галактоза	C ₆ H ₁₂ O ₆		180,156
Седогептулоза	C ₇ H ₁₄ O ₇		210,18
Кетози			
Дигідроксиацетон	C ₃ H ₆ O ₃		90,08
Рибулоза	C ₅ H ₁₀ O ₅		150,13
Ксилулоза	C ₅ H ₁₀ O ₅		150,13
Фруктоза	C ₆ H ₁₂ O ₆		180,16
Спирти			
Гліцерин	C ₃ H ₈ O ₃ або C ₃ H ₅ OH ₃		92,09
Еритритол	C ₄ H ₁₀ O ₄		122,12

Назва	Формула		Молекулярна маса, г/моль
	Емпірична	Структурна	
Ксиліт	$C_5H_{12}O_5$		152,15
Сорбіт	$C_6H_{14}O_6$		182,17
Уронові кислоти			
Глюкуронова кислота	$C_6H_{10}O_7$		194,14
Галактуронова кислота	$C_6H_{10}O_7$		194,1
Кислоти			
Глюконова кислота	$C_6H_{12}O_7$		196,16
Дисахариди			
Сахароза	$C_{12}H_{22}O_{11}$		342,30
Лактоза	$C_{12}H_{22}O_{11}$		342,2965
Мальтоза	$C_{12}H_{22}O_{11}$		342,30
Трегалоза	$C_{12}H_{22}O_{11}$ (ангідрид)		342,2965
Олігосахариди			
Рафіноза	$C_{18}H_{32}O_{16}$		504,42
Стахіоза	$C_{24}H_{42}O_{21}$		666,578

Таблиця 5д

Густина розчинів деяких кислот та луг різної концентрації за 15 °С

Концент- рація	H ₂ SO ₄	HNO ₃	HCl	H ₃ PO ₄	CH ₃ COOH	KOH	NaOH	NH ₃
2	1,013	1,011	1,009	1,010	1,003	1,016	1,023	0,992
4	1,027	1,022	1,019	1,022	1,006	1,033	1,046	0,983
6	1,040	1,033	1,029	1,033		1,048	1,069	0,973
8	1,055	1,044	1,039	1,045	1,010	1,065	1,092	0,967
10	1,069	1,055	1,049	1,056		1,082	1,115	0,960
12	1,083	1,068	1,059	1,067	1,015	1,100	1,137	0,953
14	1,098	1,080	1,069	1,079		1,118	1,159	0,946
16	1,112	1,098	1,079	1,091	1,020	1,137	1,181	0,939
18	1,127	1,106	1,089	1,103		1,156	1,203	0,932
20	1,143	1,119	1,100	1,119	1,025	1,176	1,225	0,926
22	1,158	1,132	1,110	1,129	1,143	1,196	1,247	0,919
24	1,174	1,145	1,121	1,143	1,031	1,217	1,268	0,913
26	1,190	1,158	1,132	1,156		1,240	1,289	0,908
28	1,205	1,171	1,142	1,170	1,035	1,263	1,310	0,903
30	1,224	1,184	1,152	1,188		1,286	1,332	0,898
32	1,238	1,198	1,163	1,204	1,040	1,310	1,352	0,893
34	1,255	1,211	1,173	1,219		1,334	1,374	0,889
36	1,273	1,225	1,383	1,233	1,045	1,358	1,395	0,884
38	1,290	1,238	1,194	1,249		1,384	1,436	
40	1,307	1,251		1,265	1,050	1,411	1,437	
42	1,324	1,264		1,281		1,437	1,458	
44	1,342	1,277		1,297		1,460	1,478	
46	1,361	1,290		1,314	1,052	1,485	1,499	
48	1,380	1,303		1,381		1,511	1,519	
50	1,399	1,316		1,348	1,058	1,538	1,540	
56	1,460	1,351		1,402	1,061	1,616	1,601	
60	1,503	1,373		1,439	1,065		1,643	
66	1,571	1,403						
68	1,594							
70	1,617							
80	1,733				1,070			
90	1,819							
92	1,830				1,065			
94	1,837							
96	1,840				1,059			
98	1,841				1,055			
100					1,050			

ДОДАТОК Б

МАТЕРІАЛИ, НЕОБХІДНІ ДЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ОБЧИСЛЕНЬ

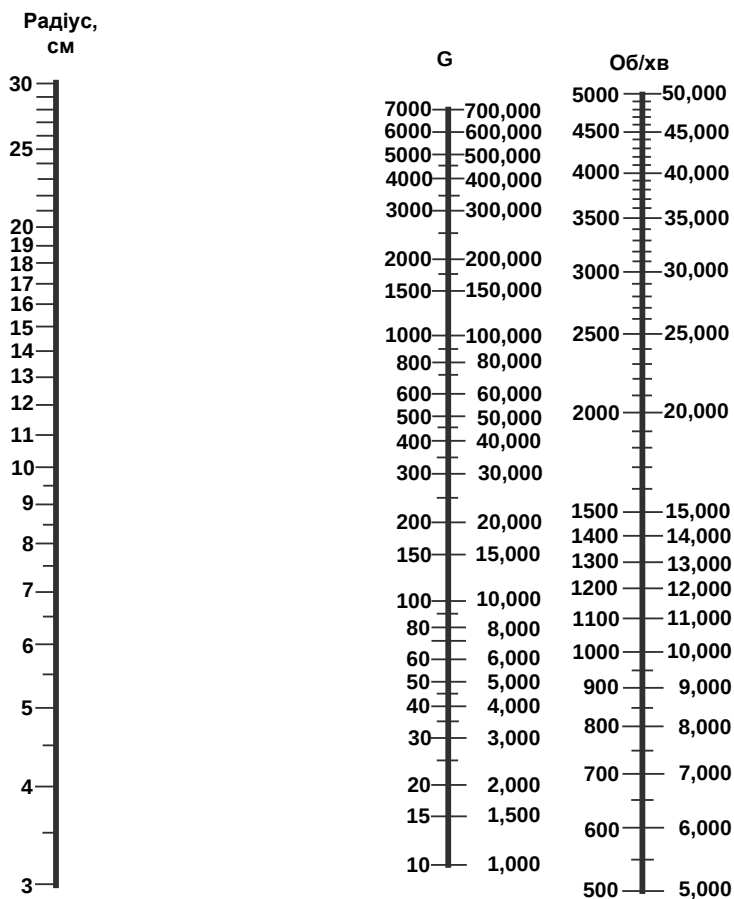


Рис. 1д. Номограма залежності показника G для центрифугування від радіусу ротора та кількості обертів ротора центрифуги

Таблиця 60

**Перерахунок кількості міді на глюкозу (у міліграмах)
для визначення редукуючих цукрів за методом Бертрана**

Мідь	Глюкоза	Мідь	Глюкоза	Мідь	Глюкоза	Мідь	Глюкоза
1,1	0,50	4,5	2,04	7,9	3,70	11,3	5,40
1,2	0,54	4,6	2,09	8,0	3,75	11,4	5,45
1,3	0,59	4,7	2,13	8,1	3,80	11,5	5,50
1,4	0,63	4,8	2,18	8,2	3,85	11,6	5,55
1,5	0,68	4,9	2,22	8,3	3,90	11,7	5,60
1,6	0,72	5,0	2,27	8,4	3,95	11,8	5,65
1,7	0,77	5,1	2,31	8,5	4,00	11,9	5,70
1,8	0,81	5,2	2,36	8,6	4,05	12,0	5,75
1,9	0,83	5,3	2,40	8,7	4,10	12,1	5,80
2,0	0,90	5,4	2,45	8,8	4,15	12,2	5,85
2,1	0,95	5,5	2,50	8,9	4,20	12,3	5,90
2,2	1,00	5,6	2,55	9,0	4,25	12,4	5,95
2,3	1,04	5,7	2,60	9,1	4,30	12,5	6,00
2,4	1,09	5,8	2,65	9,2	4,35	12,6	6,05
2,5	1,13	5,9	2,70	9,3	4,40	12,7	6,10
2,6	1,18	6,0	2,75	9,4	4,45	12,8	6,15
2,7	1,22	6,1	2,80	9,5	4,50	12,9	6,20
2,8	1,27	6,2	2,85	9,6	4,55	13,0	6,25
2,9	1,31	6,3	2,90	9,7	4,60	13,1	6,30
3,0	1,36	6,4	2,95	9,8	4,65	13,2	6,35
3,1	1,40	6,5	3,00	9,9	4,70	13,3	6,40
3,2	1,45	6,6	3,05	10,0	4,75	13,4	6,45
3,3	1,50	6,7	3,10	10,1	4,80	13,5	6,50
3,4	1,54	6,8	3,15	10,2	4,85	13,6	6,55
3,5	1,59	6,9	3,20	10,3	4,90	13,7	6,60
3,6	1,63	7,0	3,25	10,4	4,95	13,8	6,65
3,7	1,68	7,1	3,30	10,5	5,00	13,9	6,70
3,8	1,72	7,2	3,35	10,6	5,05	14,0	6,75
3,9	1,77	7,3	3,40	10,7	5,10	14,1	6,80
4,0	1,81	7,4	3,45	10,8	5,15	14,2	6,85
4,1	1,83	7,5	3,50	10,9	5,20	14,3	6,90
4,2	1,90	7,6	3,55	11,0	5,25	14,4	6,95
4,3	1,95	7,7	3,60	11,1	5,30	14,5	7,00
4,4	2,00	7,8	3,65	11,2	5,35	14,6	7,05
14,7	7,10	15,9	7,70	17,2	8,30	18,3	8,90
14,8	7,15	16,0	7,75	17,2	8,35	18,4	8,95
14,9	7,20	16,1	7,80	17,3	8,40	18,5	9,00
15,0	7,25	16,2	7,85	17,4	8,45	18,6	9,05
15,1	7,30	16,3	7,90	17,5	8,50	18,7	9,10
15,2	7,35	16,4	7,95	17,6	8,55	18,8	9,15
15,3	7,40	16,5	8,00	17,7	8,60	18,9	9,20
15,4	7,45	16,6	8,05	17,8	8,65	19,0	9,25
15,5	7,50	16,7	8,10	17,9	8,70	19,1	9,30
15,6	7,55	16,8	8,15	18,0	8,75	19,2	9,35
15,7	7,60	16,9	8,20	18,1	8,80	19,3	9,40
15,8	7,65	17,0	8,25	18,2	8,85	19,4	9,45

Таблиця 70

Визначення кількості сульфату амонію $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, яку необхідно додати до розчину відомого вихідного насичення для отримання нового відсотка насичення (за 0°C), г

Початкова кон- центрація $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, % насичення	Кінцева концентрація сульфату амонію, % насичення														
	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90
	Вага твердого сульфату амонію, який потрібно додати до 100 мл розчину, г														
0	10,6	13,4	16,4	19,4	22,6	25,8	29,1	32,6	36,1	39,8	43,6	47,6	51,6	55,9	60,3
5	7,9	10,8	13,7	16,6	19,7	22,9	26,2	29,6	33,1	36,8	40,5	44,4	48,4	52,6	57,0
10	5,3	8,1	10,9	13,9	16,9	20,0	23,3	26,6	30,1	33,7	37,4	41,2	45,2	49,3	53,6
15	2,6	5,4	7,8	11,1	14,1	17,2	20,4	23,7	27,1	30,6	34,3	38,1	42,0	46,0	50,3
20	0	2,7	5,3	8,3	11,3	14,3	17,5	20,7	24,1	27,6	31,2	34,9	38,7	42,7	46,9
25		0	2,7	5,6	8,4	11,5	14,6	17,9	21,1	24,9	28,0	31,7	35,5	39,5	43,5
30			0	2,8	5,5	8,6	11,7	14,8	18,1	21,4	24,9	28,5	32,3	36,2	40,2
35				0	2,8	5,7	8,7	11,8	15,1	18,4	21,8	25,4	29,1	32,9	36,9
40					0	2,9	5,8	8,9	12,0	15,3	18,7	22,2	25,8	29,6	33,5
45						0	2,9	5,9	9,0	12,3	15,6	19,0	22,6	26,3	30,2
50							0	3,0	6,0	9,2	12,5	15,9	19,4	23,0	26,8
55								0	3,0	6,1	9,5	12,7	16,1	19,7	23,5
60									0	3,1	6,3	9,3	12,9	16,4	20,1
65										0	3,1	6,3	9,7	13,2	18,8
70											0	3,2	6,5	9,9	13,4
75												0	3,2	6,6	10,1
80													0	3,3	6,7
85														0	3,4
90															0
95															0
100															0

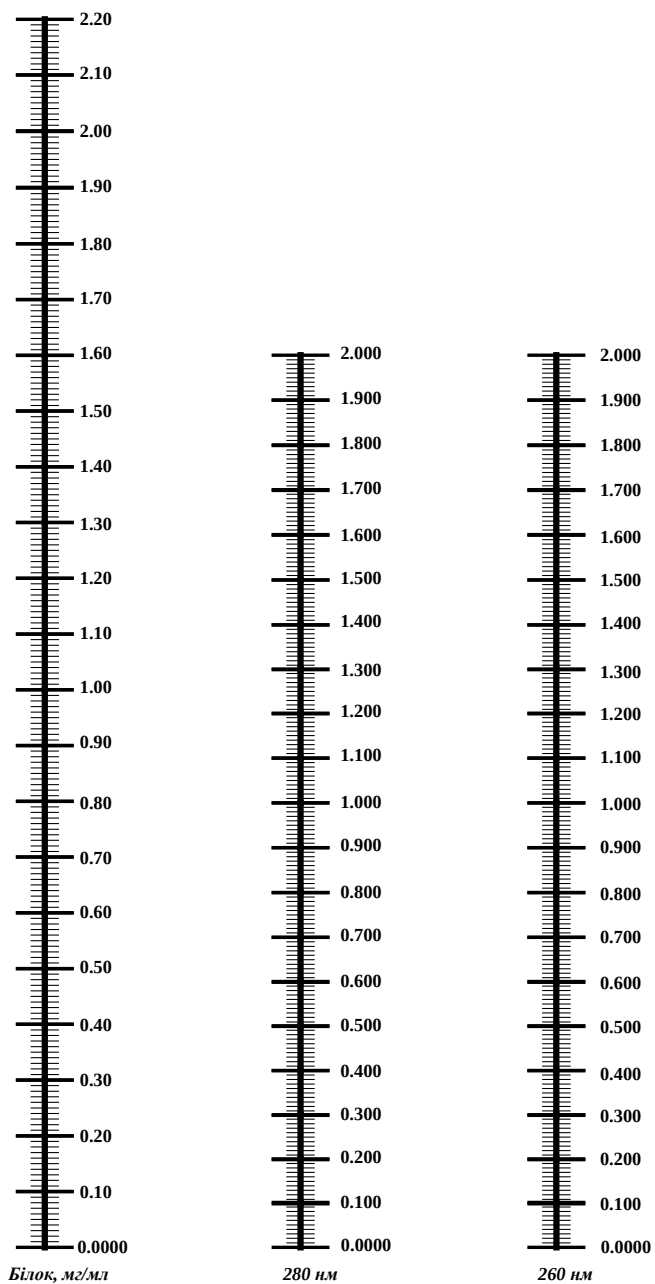


Рис. 2д. Номограма для розрахунку вмісту білка

ДОДАТОК В

ПРИГОТУВАННЯ ДЕЯКИХ БУФЕРНИХ РОЗЧИНІВ

Буферні розчини призначено для підтримання певного значення рН реакційного середовища. Частіше за все вони готуються змішуванням двох розчинів солей, кислот або лугів. Об'ємні співвідношення розчинів наводяться у таблицях. Після змішування розчинів потрібно перевірити рН буферного розчину на рН-метрі, і якщо воно не відповідає потрібному значенню, додати лужного або кислотного розчину для забезпечення необхідної кислотності.

Розчини речовин для приготування буферних сумішей готуються з реактивів високого ступеня очистки (марка ч. д. а. або х. ч.). Треба звертати увагу на вміст води в реактивах. Якщо розрахунки наведено для безводних реактивів, а в наявності реактиви, які містять кристалізаційну воду, потрібно обчислити кількість реактиву, враховуючи цю воду.

1. Боротна буферна суміш (рН 7,62–9,17)

Готують, змішуючи 0,05 N розчини бури та соляної кислоти.

рН	0,05 N розчину, мл		рН	0,05 N розчину, мл	
	бури	HCl		бури	HCl
7,62	52,5	47,5	8,80	75,0	25,0
7,94	55,0	45,0	8,91	80,0	20,0
8,14	57,5	42,5	9,01	85,0	15,0
8,29	60,0	40,0	9,09	90,0	10,0
8,51	65,0	35,0	9,17	95,0	5,0
8,68	70,0	30,0			

Приготування розчинів:

– 0,05 N розчин бури – зважують 10,061 г безводної солі ($\text{Na}_2\text{B}_2\text{O}_7$) або 19,096 г водної солі ($\text{Na}_2\text{B}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$), розчиняють у 700–800 мл дистильованої води і об'єм розчину доводять до 1 л дистильованою водою у мірчій колбі;

– 0,05 N розчин соляної кислоти (HCl) – беруть 4,25 мл концентрованої соляної кислоти (густина 1,19) та розводять до 1 л дистильованою водою.

2. Цитратний буферний розчин Серенса (рН 1,1–6,6)

Готують, змішуючи 0,1 N розчини лимоннокислого натрію, соляної кислоти та гідроксиду натрію.

рН	0,1 N розчин, мл		рН	0,1 N розчин, мл		
	Цитрат натрію	HCl		Цитрат натрію	HCl	NaOH
1,1	4,8	95,2	4,0	56,0	44,0	
1,3	15,9	84,1	4,2	61,1	38,9	
1,5	22,2	77,8	4,4	67,9	32,1	
1,7	26,5	73,5	4,6	76,9	23,1	
1,9	29,5	70,5	4,8	88,0	12,0	
2,0	30,6	69,4	5,0	96,4		3,6

рН	0,1 N розчин, мл		рН	0,1 N розчин, мл		
	Цитрат натрію	HCl		Цитрат натрію	HCl	NaOH
2,2	32,6	67,4	5,2	85,1		14,6
2,4	34,5	65,5	5,3	80,7		19,3
2,6	36,4	63,6	5,4	76,3		23,7
2,8	38,3	61,7	5,6	69,0		31,0
3,0	40,3	59,7	5,8	63,6		36,4
3,2	42,7	57,3	6,0	59,6		40,4
3,4	45,6	54,6	6,2	56,6		40,4
3,6	48,4	51,6	6,4	54,6		45,4
3,8	51,9	48,1	6,6	53,0		47,0

Приготування розчинів:

– 0,1 N розчин цитрату натрію – розчиняють 21,008 г лимонної кислоти (моногідрату) у 200–300 мл дистильованої води та додають 200 мл 1 N розчину гідроксиду натрію (40 г NaOH у 1 л розчину). Об’єм розчину доводять дистильованою водою в мірчій колбі до 1 л;

– 0,1 N розчин соляної кислоти – беруть 8,5 мл концентрованої соляної кислоти (густина 1,19) і розводять у мірчій колбі до 1 л дистильованою водою;

– 0,1 N розчин гідроксиду натрію (NaOH) – зважують 4 г гідроксиду натрію, розчиняють у дистильованій воді і доводять об’єм розчину дистильованою водою до 1 л у мірчій колбі.

3. Фосфатна буферна суміш Серенса (рН 4,94–9,18)

Для приготування буферного розчину з необхідною рН змішують розчини фосфату натрію двозаміщеного і фосфату калію однозаміщеного в таких співвідношеннях:

рН	Об’єми розчинів		рН	Об’єми розчинів	
	Na ₂ HPO ₄	KH ₂ PO ₄		Na ₂ HPO ₄	KH ₂ PO ₄
4,94	0,10	9,90	6,98	6,00	4,00
5,29	0,25	9,75	7,17	7,00	3,00
5,59	0,50	9,50	7,38	8,00	2,00
5,91	1,00	9,00	7,73	9,00	1,00
6,24	2,00	8,00	8,04	9,50	0,50
6,47	3,00	7,00	8,34	9,75	0,25
6,64	4,00	6,00	8,67	9,90	0,10
6,81	5,00	5,00	9,18	10,00	0,00

Приготування розчинів:

– розчин фосфату натрію двозаміщеного (Na₂HPO₄) – зважують 11,876 г солі Na₂HPO₄·12H₂O, розчиняють у дистильованій воді і об’єм розчину доводять дистильованою водою до 1 л;

– розчин фосфату калію однозаміщеного (KH₂PO₄) – зважують 9,078 г солі KH₂PO₄, розчиняють у дистильованій воді і доводять об’єм розчину дистильованою водою до 1 л.

4. Ацетатна буферна суміш (рН 3,6–5,8)

Для приготування суміші із зазначеними значеннями рН за 18 °С змішують такі об'єми 0,2 М розчинів ацетату натрію та оцтової кислоти:

рН	Об'єми розчинів		рН	Об'єми розчинів	
	CH ₃ COONa	CH ₃ COOH		CH ₃ COONa	CH ₃ COOH
3,6	0,75	9,25	4,8	5,90	4,10
3,8	1,20	8,80	5,0	7,00	3,00
4,0	1,80	8,20	5,2	7,90	2,10
4,2	2,65	7,35	5,4	8,60	1,40
4,4	3,70	6,30	5,6	9,10	0,90
4,6	4,90	5,10	5,8	9,40	0,60

Приготування розчинів:

– 0,2 М розчин ацетату натрію (CH₃COONa) – зважують 27,216 г ацетату натрію водного (CH₃COONa·3H₂O), розчиняють у дистильованій воді і доводять об'єм дистильованою водою до 1 л у мірчій колбі;

– 0,2 М розчин оцтової кислоти (CH₃COOH) – беруть 11,44 мл оцтової кислоти концентрованої (густина 1,05) та доводять об'єм розчину дистильованою водою до 1 л у мірчій колбі.

5. Універсальна буферна суміш (рН 1,81–11,82)

Для приготування буферного розчину до 100 мл суміші 0,04 N розчинів фосфорної, оцтової та борної кислот (суміш готується змішуванням рівних об'ємів 0,04 N розчинів кислот) додають відповідну кількість 0,2 N розчину гідроксиду натрію.

рН	NaOH	рН	NaOH	рН	NaOH	рН	NaOH
1,81	0,0	4,10	25,0	7,24	55,0	11,20	85,0
1,98	5,0	4,56	30,0	7,96	60,0	11,58	90,6
2,09	5,5	5,02	35,0	8,69	65,0	11,82	95,0
2,21	10,0	5,72	40,0	9,15	70,0		
2,56	15,0	6,37	45,0	9,62	75,0		
3,29	20,0	6,80	50,0	10,98	80,0		

Приготування розчинів:

– 0,04 N розчин фосфорної кислоти (H₃PO₄) – беруть 0,8 мл 80 % ортофосфорної кислоти (густина 1,633) і розводять дистильованою водою до 1 л у мірчій колбі;

– 0,04 N розчин оцтової кислоти (CH₃COOH) – беруть 2,29 мл концентрованої оцтової кислоти (густина 1,05) і розводять дистильованою водою до 1 л у мірчій колбі;

– 0,04 N розчин борної кислоти (H₃BO₄) – зважують 0,824 г борної кислоти, розчиняють у дистильованій воді і доводять об'єм розчину у мірчій колбі дистильованою водою до 1 л;

– 0,2 N розчин гідроксиду натрію (NaOH) – зважують 8 г гідроксиду натрію, розчиняють у дистильованій воді та доводять об'єм розчину дистильованою водою до 1 л у мірчій колбі.

6. Буферні розчини, які дають можливість працювати за різноманітних значень водневого показника

Гліцин–HCl буфер (0,05 M, pH 2,2–3,6)

pH	0,2 M гліцин, мл	0,2 M HCl, мл	Вода, мл	pH	0,2 M гліцин, мл	0,2 M HCl, мл	Вода, мл
2,2	50	44,0	до 200	3,0	50	11,4	до 200
2,4	50	32,4	до 200	3,2	50	8,2	до 200
2,6	50	24,2	до 200	3,4	50	6,4	до 200
2,8	50	16,8	до 200	3,6	50	5,0	до 200

Молекулярна маса гліцину = 75,07 г/моль.

Фосфатно-цитратний буфер (pH 2,2–8,0)

pH	Na ₂ HPO ₄ 0, M, мл	Лимонна кислота 0,1 M, мл	pH	Na ₂ HPO ₄ 0, M, мл	Лимонна кислота 0,1 M, мл
2,2	0,40	19,60	5,2	10,72	9,28
2,4	1,24	18,76	5,4	11,15	8,85
2,6	2,18	17,82	5,6	11,60	8,40
2,8	3,11	16,83	5,8	12,09	7,91
3,0	4,11	15,89	6,0	12,63	7,37
3,2	4,94	15,06	6,2	13,22	6,78
3,4	5,70	14,30	6,4	13,85	6,15
3,6	6,44	13,56	6,6	14,55	5,45
3,8	7,10	12,90	6,8	15,45	4,55
4,0	7,71	12,29	7,0	16,47	3,53
4,2	8,28	11,72	7,2	17,39	2,61
4,4	8,82	11,18	7,4	18,17	1,83
4,6	9,35	10,65	7,6	8,73	1,27
4,8	9,86	10,14	7,8	19,15	0,85
5,0	10,30	9,70	8,0	19,45	0,55

Молекулярна маса Na₂HPO₄·2H₂O = 178,05 г/моль;

молекулярна маса лимонної кислоти = 210,14 г/моль.

Цей буфер не може бути використаний, якщо в розчині присутні іони кальцію або магнію.

Цитратний буфер (0,1 M, pH 3,0–6,2)

pH	Лимонна кислота 0,1 M, мл	Цитрат натрію 0,1 M, мл	pH	Лимонна кислота 0,1 M, мл	Цитрат натрію 0,1 M, мл
3,0	16,4	3,6	4,8	8,0	12,0
3,2	15,5	4,5	5,0	7,0	13,0
3,4	14,6	5,4	5,2	6,1	13,9
3,6	13,7	6,3	5,4	5,1	14,9
3,8	12,7	7,3	5,6	4,2	15,8
4,0	11,8	8,2	5,8	3,2	16,8
4,2	10,8	9,2	6,0	2,3	17,7
4,4	9,9	10,1	6,2	1,6	18,4
4,6	8,9	11,1			

Молекулярна маса лимонної кислоти водної = 210,14 г/моль;

молекулярна маса тризаміщеного цитрату натрію водного = 294,12 г/моль.

Ацетатний буфер (0,2 М, рН 3,6–5,8 за 18 °С)

рН	CH ₃ COONa 0,2 М, мл	CH ₃ COOH 0,2 М, мл	рН	CH ₃ COONa 0,2 М, мл	CH ₃ COOH 0,2 М, мл
3,6	0,75	9,25	4,8	5,90	4,10
3,8	1,20	8,80	5,0	7,00	3,00
4,0	1,80	8,20	5,2	7,90	2,10
4,2	2,65	7,35	5,4	8,60	1,40
4,4	3,70	6,30	5,6	9,10	0,90
4,6	4,90	5,10	5,8	3,40	0,60

Молекулярна маса CH₃COONa·3H₂O = 136,09 г/моль.

Сукцинатний буфер (0,05 М, рН 3,8–6,0)

рН	Бурштинова кислота 0,2 М, мл	NaOH 0,2 М, мл	Вода, мл	рН	Бурштинова кислота 0,2 М, мл	NaOH 0,2 М, мл	Вода, мл
3,8	25	7,5	до 100	5,0	25	26,7	до 100
4,0	25	10,0	до 100	5,2	25	30,3	до 100
4,2	25	13,3	до 100	5,4	25	34,2	до 100
4,4	25	16,7	до 100	5,6	25	37,5	до 100
4,6	25	20,0	до 100	5,8	25	40,7	до 100
4,8	25	23,5	до 100	6,0	25	43,5	до 100

Молекулярна маса бурштинової кислоти = 118,09 г/моль.

Малеатний буфер (0,05 М, рН 5,2–6,8 за 25 °С)

рН	NaOH 0,2 М, мл	Малеат натрію 0,2 М, мл	Вода, мл	рН	NaOH 0,2 М, мл	Малеат натрію 0,2 М, мл	Вода, мл
5,2	7,2	50	до 200	6,2	33,0	50	до 200
5,4	10,5	50	до 200	6,4	38,0	50	до 200
5,6	15,3	50	до 200	6,6	41,6	50	до 200
5,8	20,8	50	до 200	6,8	44,4	50	до 200
6,0	26,9	50	до 200				

Для приготування однозаміщеного малеату натрію 0,2 М розчиняють у воді 23,2 г малеїнової кислоти (або 19,6 г малеїнового ангідриду) та 8 г гідроксиду натрію і загальний об'єм доводять водою до 1 л

Фосфатний буфер (0,1 М, рН 5,8–8,0)

рН	Двозаміше- ний фосфат натрію 0,2 М, мл	Однозамі- щений фос- фат натрію 0,2 М	Вода, мл	рН	Двозаміше- ний фосфат натрію 0,2 М, мл	Однозамі- щений фос- фат натрію 0,2 М	Вода, мл
5,8	8,0	92,0	до 200	7,0	61,0	39,0	до 200
6,0	12,3	87,7	до 200	7,2	72,0	28,0	до 200
6,2	18,5	81,5	до 200	7,4	81,0	19,0	до 200
6,4	26,5	73,5	до 200	7,6	87,0	13,0	до 200
6,6	37,5	62,5	до 200	7,8	91,5	8,5	до 200
6,8	49,0	51,0	до 200	8,0	94,7	5,3	до 200

Молекулярна маса двозаміщеного фосфату натрію $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} = 178,05$,
 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O} = 358,22$ г/моль;

молекулярна маса однозаміщеного фосфату натрію $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} = 138,0$,
 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} = 156,03$ г/моль.

Фосфатний буфер (0,05 М, рН 5,8–8,0 за 25 °С)

рН	KH_2PO_4 0,2 М, мл	КОН або NaOH 0,2 М, мл	Вода, мл	рН	KH_2PO_4 0,2 М, мл	КОН або NaOH 0,2 М, мл	Вода, мл
5,8	5	0,36	до 20	7,0	5	2,91	до 20
6,0	5	0,56	до 20	7,2	5	3,47	до 20
6,2	5	0,81	до 20	7,4	5	3,91	до 20
6,4	5	1,16	до 20	7,6	5	4,24	до 20
6,6	5	1,64	до 20	7,8	5	4,45	до 20
6,8	5	2,24	до 20	8,0	5	4,61	до 20

Молекулярна маса однозаміщеного фосфату калію = 136,09 г/моль.

Арсенатний буфер (0,05 М, рН 5,8–7,6 за 25 °С)

рН	Арсенат натрію двозаміщений 0,1 М, мл	HCl 0,1 М, мл	Вода, мл	рН	Арсенат натрію двозаміщений 0,1 М, мл	HCl 0,1 М, мл	Вода, мл
5,8	25	21,6	до 50	6,8	25	9,0	до 50
6,0	25	20,5	до 50	7,0	25	6,2	до 50
6,2	25	18,9	до 50	7,2	25	4,1	до 50
6,4	25	16,5	до 50	7,4	25	2,6	до 50
6,6	25	12,7	до 50	7,6	25	1,6	до 50

Молекулярна маса двозаміщеного арсенату натрію: $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} = 312,03$ або $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O} = 402,10$ г/моль.

Карбонатний буфер (рН 6,0–8,0 за 37 °С)

рН	Концентрація бікарбонату в рівновазі з газовою фазою, що містить 5 % CO_2 , М	рН	Концентрація бікарбонату в рівновазі з газовою фазою, що містить 5 % CO_2 , М
6,0	$5,86 \times 10^{-4}$	7,2	$9,29 \times 10^{-3}$
6,2	$9,29 \times 10^{-4}$	7,4	$1,47 \times 10^{-2}$
6,4	$1,47 \times 10^{-3}$	7,6	$2,33 \times 10^{-2}$
6,6	$2,33 \times 10^{-3}$	7,8	$3,70 \times 10^{-2}$
6,8	$3,70 \times 10^{-3}$	8,0	$5,86 \times 10^{-2}$
7,9	$5,86 \times 10^{-3}$		

Молекулярна маса бікарбонату натрію = 84,02 г/моль.

Наведені нижче числові величини концентрацій бікарбонату можуть бути використані за величини атмосферного тиску 725–760 мм рт. ст. За температури 20 °С концентрація бікарбонату повинна бути збільшена приблизно на 1,88 %, щоб одержати ті самі значення рН, які зазначені в таблиці для 37 °С.

Бікарбонатний буфер (0,1 М, рН 9,2–10,8)

рН за		Карбонат натрію 0,1 М, мл	Бікарбонат натрію 0,1 М, мл	рН за		Карбонат натрію 0,1 М, мл	Бікарбонат натрію 0,1 М, мл
20 °С	37 °С			20 °С	37 °С		
9,16	8,77	1	9	10,14	9,90	6	4
9,40	9,12	2	8	10,28	10,08	7	3
9,51	9,40	3	7	10,53	10,28	8	2
9,78	9,50	4	6	10,83	10,57	9	1
9,90	9,72	5	5				

Молекулярна маса $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O} = 286,2$, $\text{NaHCO}_3 = 84,0$ г/моль.

Цей буфер не може бути використаний, якщо в середовищі присутні іони кальцію або магнію.

Імідазольний буфер (0,05 М, рН 6,2–7,8 за 25 °С)

рН	Імідазол 0,2 М, мл	HCl 0,1 М, мл	Вода, мл	рН	Імідазол 0,2 М, мл	HCl 0,1 М, мл	Вода, мл
6,2	25	42,9	до 100	7,2	25	18,6	до 100
6,4	25	39,8	до 100	7,4	25	13,6	до 100
6,6	25	35,5	до 100	7,6	25	9,3	до 100
6,8	25	30,4	до 100	7,8	25	6,0	до 100
7,0	25	24,3	до 100				

Молекулярна маса імідазолу = 68,08 г/моль.

Діетилбарбітуратний (вероналовий) буфер, рН 6,8–9,6

рН	Натрій-діетилбарбітурат 0,04 М, мл	HCl, 0,2 М, мл	рН	Натрій-діетилбарбітурат 0,04 М, мл	HCl, 0,2 М, мл
6,8	100	18,4	8,4	100	5,21
7,0	100	17,8	8,6	100	3,82
7,2	100	16,7	8,8	100	2,52
7,4	100	15,3	9,0	100	1,65
7,6	100	13,4	9,2	100	1,13
7,8	100	11,47	9,4	100	0,70
8,0	100	9,39	9,6	100	0,35
8,2	100	7,21			

Молекулярна маса натрій-діетилбарбітурату = 206,2 г/моль.

Триетаноламіновий буфер (0,005 М, рН 7,1–8,6 за 25 °С)

рН	Триетаноламін 0,01 М, мл	HCl 0,01 М, мл	Вода, мл	рН	Триетаноламін 0,01 М, мл	HCl 0,01 М, мл	Вода, мл
7,10	10	8,13	до 20	7,94	10	4,06	до 20
7,35	10	7,11	до 20	8,13	10	3,05	до 20
7,57	10	6,10	до 20	8,37	10	2,03	до 20
7,76	10	5,08	до 20	8,62	10	1,02	до 20

Молекулярна маса триетаноламіну = 149,2 г/моль.

Трис-НCl буфер (0,05 М, рН 7,2–9,1)

рН		Трис 0,2 М, мл	HCl 0,1 М, мл	Вода, мл
23 °С	37 °С			
7,20	7,05	25	45,0	до 100
7,36	7,22	25	42,5	до 100
7,54	7,40	25	40,0	до 100
7,66	7,52	25	37,5	до 100
7,77	7,63	25	35,0	до 100
7,87	7,73	25	32,5	до 100
7,96	7,82	25	30,0	до 100
8,05	7,90	25	27,5	до 100
8,14	8,00	25	25,0	до 100
8,23	8,10	25	22,5	до 100
8,32	8,18	25	20,0	до 100
8,40	8,27	25	17,5	до 100
8,50	8,37	25	15,0	до 100
8,62	8,48	25	12,5	до 100
8,74	8,60	25	10,0	до 100
8,92	8,78	25	7,5	до 100
9,10	8,95	25	5,0	до 100

Молекулярна маса трис = 121,14, HCl = 36,5 г/моль.

Триетаноламіновий буфер (0,05 М, рН 6,8–8,6 за 25 °С)

рН	Триетаноламін- соляна кислота 0,1 М, мл	NaOH 0,1 М, мл	Вода, мл	рН	Триетаноламін- соляна кислота 0,1 М, мл	NaOH 0,1 М, мл	Вода, мл
6,8	10	1,20	до 20	7,8	10	5,20	до 20
7,0	10	1,80	до 20	8,0	10	6,30	до 20
7,2	10	2,43	до 20	8,2	10	7,20	до 20
7,4	10	3,16	до 20	8,4	10	8,00	до 20
7,6	10	4,01	до 20	8,6	10	9,20	до 20

Молекулярна маса триетаноламін-HCl = 185,7 г/моль.

Боратний буфер (0,2 М, рН 7,4–9,0)

рН	Бура 0,05 М, мл	Борна кислота 0,2 М, мл	рН	Бура 0,05 М, мл	Борна кислота 0,2 М, мл
7,4	1,0	9,0	8,2	3,5	6,5
7,6	1,5	8,5	8,4	4,5	5,5
7,8	2,0	8,0	8,7	6,0	4,0
8,0	3,0	7,0	9,0	8,0	2,0

Молекулярна маса бури ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) = 381,43; борної кислоти (H_3BO_3) = 61,84 г/моль.

Боратний буфер (0,05 М, рН 9,3–10,1)

рН	Бура 0,05 М, мл	NaOH, 0,2 М, мл	Вода, мл	рН	Бура 0,05 М, мл	NaOH, 0,2 М, мл	Вода, мл
9,3	50	0,0	до 200	9,8	50	34,0	до 200
9,4	50	11,0	до 200	10,0	50	43,0	до 200
9,6	50	23,0	до 200	10,1	50	46,0	до 200

Диетаноламіновий буфер (0,05 М, рН 8,0–10,0 за 25 °С)

рН	Диетаноламін 0,2 М, мл	HCl 0,1 М, мл	Вода, мл	рН	Диетаноламін 0,2 М, мл	HCl 0,1 М, мл	Вода, мл
10,0	25	3,6	до 100	8,9	25	27,1	до 100
9,7	25	6,9	до 100	8,7	25	32,7	до 100
9,5	25	11,1	до 100	8,5	25	37,7	до 100
9,3	25	15,6	до 100	8,3	25	42,0	до 100
9,1	25	20,4	до 100	8,0	25	45,9	до 100

Молекулярна маса диетаноламіну = 105,1 г/моль.

Гліциновий буфер (0,05 М, рН 8,6–10,6)

рН	Гліцин 0,2 М, мл	NaOH 0,2 М, мл	Вода, мл	рН	Гліцин 0,2 М, мл	NaOH, 0,2 М, мл	Вода, мл
8,6	50	4,0	до 200	9,6	50	22,4	до 200
8,8	50	6,0	до 200	9,8	50	27,2	до 200
9,0	50	8,8	до 200	10,0	50	32,0	до 200
9,2	50	12,0	до 200	10,4	50	38,6	до 200
9,4	50	16,8	до 200	10,6	50	45,5	до 200

Молекулярна маса гліцину = 75,07 г/моль.

Гліцил-гліциновий буфер

Приготування. Розраховану наважку гліцил-гліцину розчиняють у половинному від необхідного об'ємі бідистильованої води (наприклад, якщо кінцевий об'єм буфера повинен бути 50 мл, то наважку гліцил-гліцину розчиняють у 25 мл). Вимірюють рН на потенціометрі за допомогою скляного електрода та додають невеликими порціями луг, увесь час контролюючи величину водневого показника. До певного рН доводять спочатку за допомогою 2–4 М розчину лугу. Потім, коли величина водневого показника стане близькою до необхідного, додають невеликі кількості 0,1–0,2 М розчину лугу. Після досягнення необхідної величини рН загальний об'єм буферного розчину доводять водою до потрібного об'єму та знову перевіряють величину водневого показника.

ЗМІСТ

Вступ	3
Правила роботи та запобіжні заходи під час роботи у біохімічній лабораторії.....	4
1. Основні поняття про розчини.....	6
1.1. Позначення концентрацій речовин у хімічному аналізі	6
1.2. Розрахунок наважок речовин для приготування розчинів	7
2. Принципи деяких методів досліджень	16
2.1. Гравіметричний аналіз.....	16
2.2. Титриметричний аналіз	21
2.3. Фотометричний метод	28
2.4. Хроматографія.....	30
2.5. Гель-електрофорез	32
3. Правила роботи на деяких аналітичних приладах	39
3.1. Правила зважування на аналітичних терезах.....	39
3.2. Правила роботи з фотоелектроколориметром КФК-2	41
3.3. Правила роботи на спектрофотометрі СФ-26.....	42
3.4. Правила роботи на спектрофотометрі GRANUM 722.	44
4. Характеристика деяких класів органічних сполук рослин	48
4.1. Білкові речовини	48
4.2. Нуклеїнові кислоти	52
4.3. Вуглеводи.....	57
4.4. Ліпіди.....	66
4.5. Вітаміни.....	69
4.6. Речовини вторинного походження.....	72
5. Аналіз мінерального складу рослин.....	75
Підготовка рослинного матеріалу до аналізу.....	75
Робота 5.1. Визначення загального азоту в насінні та вегетативних органах рослин (за методом Х. Н. Починка).....	79
Робота 5.2. Визначення нітратного азоту в рослинах із дисульфогеновою кислотою	82
Робота 5.3. Визначення вмісту нітратів у рослинах за допомогою іонселективного електрода	85
Робота 5.4. Визначення амонійного азоту за методом Конвея.....	87
Робота 5.5. Визначення фосфору за «синім» фосфорномолібденовим комплексом за методом Лоурі та Лопеса	89
Робота 5.6. Визначення фосфору за утворенням «жовтого» фосфорномолібденового комплексу за методом Бернарда	90

Робота 5.7. Визначення фосфору за методом Кондрашової	92
Робота 5.8. Визначення сірки у рослинному матеріалі.....	93
Робота 5.9. Визначення сірки у вигляді S^{2-} після відновної гідрогенізації	96
Робота 5.10. Визначення калію кобальтинітритним методом	99
Робота 5.11. Визначення калію методом осадження тетрафторборною кислотою.....	101
Робота 5.12. Колориметричне визначення калію з реактивом Грісса.....	102
Робота 5.13. Об'ємометричне визначення калію за допомогою фероціаніду магнію.....	103
Робота 5.14. Колориметричне визначення кальцію з кальціоном.....	105
Робота 5.15. Визначення магнію комплексометричним методом	107
Робота 5.16. Визначення заліза з о-фенантроліном	108
Робота 5.17. Визначення заліза сульфосаліциловим методом	109
Робота 5.18. Визначення міді з діетилдитіокарбаматом.....	111
Робота 5.19. Колориметричне визначення цинку з дитиозоном.....	112
Робота 5.20. Визначення марганцю персульфатним методом	114
Робота 5.21. Визначення бору з хіналізарином	117
Робота 5.22. Визначення молібдену роданідним методом	119
Робота 5.23. Визначення молібдену кінетичним методом за Панталером	122
Робота 5.24. Визначення вмісту іонів фтору у рослинному матеріалі іон-селективним методом (за J. S. Jacobson та L. I. Heller)	124
6. Аналіз вуглеводів у рослинах	126
Робота 6.1. Визначення вмісту редуруючих цукрів (за методом Бертрана)....	126
Робота 6.2. Колориметричне визначення вмісту редукуючих цукрів (за Приседським та Ніщенко).....	129
Робота 6.3. Визначення вмісту глюкози за допомогою глюкозооксидази	131
Робота 6.4. Антроновий метод визначення цукрів та крохмалю.....	133
Робота 6.5. Мікрометод визначення цукрів (за Швецовою та Лук'яненко)....	135
Робота 6.6. Визначення фруктози та інших кетоцукрів (за методом Мак-Рері та Слаттері)	136
Робота 6.7. Визначення вмісту фруктозанів за методом Х. Н. Починка	138
Робота 6.8. Визначення глюкози, фруктози та сахарози в рослинах у одній наважці (за методом Х. Н. Починка)	140
Робота 6.9. Якісне визначення цукрів методом хроматографії на папері	144
Робота 6.10. Якісне розділення цукрів на радіальній хроматограмі	146
Робота 6.11. Визначення вмісту крохмалю об'ємним методом (за методом Х. Н. Починка).....	148
Робота 6.12. Колориметричний метод визначення вмісту крохмалю (за методом Х. П. Починка).....	149

Робота 6.13. Визначення вмісту целюлози за методом Х. Н. Починка	152
Робота 6.14. Визначення вмісту пектинових речовин у рослинах.....	155
7. Аналіз ліпідів рослин.....	158
Робота 7.1. Екстракція сумарних ліпідів із рослинних тканин	158
Робота 7.2. Визначення масової частки жирів методом вичерпної екстракції	159
Робота 7.3. Рефрактометричний метод визначення вмісту ліпідів	162
Робота 7.4. Рефрактометричний метод визначення вмісту жирів у олійному насінні	166
Робота 7.5. Визначення кислотного числа світлих олій	168
Робота 7.6. Визначення кислотного числа темних олій.....	169
Робота 7.7. Визначення кислотного числа олій в насінні	170
Робота 7.8. Визначення пероксидного числа жирів та олій (ДСТУ 4570:2006).....	171
Робота 7.9. Визначення йодного числа методом Кауфмана.....	174
Робота 7.10. Визначення йодного числа методом Гюбля	176
Робота 7.11. Визначення йодного числа жиру методом Війса.....	178
Робота 7.12. Визначення йодного числа жиру прискореним методом (методом Маргошеса).....	179
Робота 7.13. Рефрактометричний метод визначення йодного числа.....	181
Робота 7.14. Визначення числа омилення	181
Робота 7.15. Визначення числа омилення	182
Робота 7.16. Методика визначення ненасиченості олій за посередництвом пероксидеканової кислоти	184
8. Аналіз білків та амінокислот у рослин.....	187
Робота 8.1. Якісні реакції на білок	187
Робота 8.2. Гранулометричний метод визначення вмісту білка у рослинному матеріалі.....	191
Робота 8.3. Визначення вмісту білкового азоту в насінні та вегетативних органах рослин (за методом Х. Н. Починка).....	192
Робота 8.4. Екстракція та очищення рослинних білків методом осадження....	194
Робота 8.5. Екстракція та очищення рослинних білків методом діалізу.....	195
Робота 8.6. Фракціонування білка та кількісне визначення окремих фракцій	197
Робота 8.7. Визначення кількості білка за допомогою реактиву Фоліна–Чокальтеу (метод Лоурі).....	201
Робота 8.8. Колориметричне визначення білка за допомогою біуретової реакції.....	203

Робота 8.9. Колориметричне визначення вмісту білка за допомогою біуретової реакції	204
Робота 8.10. Визначення вмісту білка за допомогою кумасі діамантового блакитного за методом Бредфорда	206
Робота 8.11. Визначення вмісту білка з допомогою кумасі діамантового блакитного у модифікації С. В. Шепілової	207
Робота 8.12. Спектрофотометричний метод визначення білка	209
Робота 8.13. Фотометричний мікрометод визначення вмісту амінного азоту у рослинах (за методом Н. І. Ястрембовича, Ф. Л. Калініна)	210
Робота 8.14. Визначення вмісту триптофану у вегетативних органах рослин	212
Робота 8.15. Визначення вмісту триптофану у насінні різних видів рослин	214
Робота 8.16. Визначення проліну за Бейтесом	215
Робота 8.17. Кількісне визначення вільних амінокислот у рослинному матеріалі методом хроматографії на папері за методом К. В. Гірі та Ф. Боде у модифікації Г. Н. Зайцевої та Н. П. Тюленєвої	217
Робота 8.18. Електрофорез рослинних білків у поліакриламідному гелі	221
9. Аналіз активності ферментів рослин	228
Робота 9.1. Визначення активності гваякол-пероксидази	228
Робота 9.2. Визначення активності бензидин-пероксидази	230
Робота 9.3. Визначення активності пероксидази в рослинному матеріалі (за О. В. Федотовим)	232
Робота 9.4. Визначення активності поліфенолоксидази (о-дифенолоксидази) йодометричним методом	233
Робота 9.5. Колориметричний метод визначення активності поліфенолоксидази	235
Робота 9.6. Визначення активності каталази	237
Робота 9.7. Спектрофотометричний метод визначення активності каталази у мікологічному матеріалі за О. В. Федотовим	239
Робота 9.8. Визначення активності каталази	241
Робота 9.9. Визначення загальної дегідрогеназної активності (за Т. Тунбергом)	242
Робота 9.10. Мікрометод визначення активності дегідрогеназ за допомогою вакуум-інфільтрації (за В. В. Пильневим)	243
Робота 9.11. Визначення активності супероксиддисмутази	245
Робота 9.12. Визначення активності супероксиддисмутази за Гіаннополітисом і Райсом	246
Робота 9.13. Визначення активності супероксиддисмутази з кверцетином	249
Робота 9.14. Визначення активності аскорбатооксидази	251

Робота 9.15. Колориметричний метод визначення активності нітратредуктази в рослинах	253
Робота 9.16. Визначення активності тирозинази	256
Робота 9.17. Визначення активності глутатіон-пероксидази	258
Робота 9.18. Визначення активності глутатіонредуктази	260
Робота 9.19. Визначення активності сахарози (інвертази) у рослинах.....	261
Робота 9.20. Визначення активності амілази	264
Робота 9.21. Визначення активності амілази за Смітом, Роєм.....	266
Робота 9.22. Визначення активності амілази у рослинних тканинах (за В. С. Асатіані у модифікації Ю. Г. Приседського).....	268
Робота 9.23. Визначення молокозсідальної (сичужної) активності.....	270
Робота 9.24. Визначення активності хлорофілази	271
Робота 9.25. Визначення активності лужної та кислої фосфатаз.....	274
Робота 9.26. Визначення активності протеїнази у проростаючому насінні ...	277
10. Аналіз вітамінів рослин	281
Робота 10.1. Якісні реакції на вітаміни.....	281
Робота 10.2. Визначення провітаміну А (каротину).....	284
Робота 10.3. Кількісне визначення вмісту вітаміну С за Тільмансом	287
Робота 10.4. Кількісне визначення вітаміну С у рослинному матеріалі	288
Робота 10.5. Кількісне визначення аскорбінової кислоти колориметричним методом за Г. Н. Чупахіною	289
Робота 10.6. Кількісне визначення вмісту вітаміну Р у рослинах за Левенталем	292
Робота 10.7. Визначення рутину (вітаміну Р)	293
Робота 10.8. Визначення нікотинової кислоти (вітамін РР)	295
11. Аналіз нуклеїнових кислот рослин.....	298
Робота 11.1. Якісні реакції на нуклеопротейди	298
Робота 11.2. Визначення вмісту РНК та ДНК в рослинах	300
Робота 11.3. Кількісне визначення ДНК реакцією з дифеніламіном за Дише	306
Робота 11.4. Отримання препаратів рослинної ДНК.....	307
Робота 11.5. Агарозний гель-електрофорез фрагментів ДНК.....	312
12. Аналіз речовин вторинного походження.....	316
Робота 12.1. Визначення загальної кислотності	316
Робота 12.2. Визначення кількості органічних кислот (за Х. Н. Починком).....	317
Робота 12.3. Визначення вільних органічних кислот (за Х. Н. Починком)	320
Робота 12.4. Визначення вмісту лимонної кислоти.....	322
Робота 12.5. Визначення лимонної кислоти (за Х. Н. Починком)	326
Робота 12.6. Визначення вмісту яблучної кислоти в рослинному матеріалі....	330

Робота 12.7. Визначення кількості щавлевої кислоти	334
Робота 12.8. Визначення щавлевої кислоти (за Х. Н. Починком)	337
Робота 12.9. Визначення вмісту у рослинах бурштинової кислоти (за Х. Н. Починком).....	341
Робота 12.10. Якісне визначення органічних кислот хроматографією на папері	345
Робота 12.11. Кількісне визначення органічних кислот із використанням іонообмінників та хроматографії на папері.....	348
Робота 12.12. Визначення ді- і трикарбонових кислот за допомогою хроматографії на папері (за Х. Н. Починком)	354
Робота 12.13. Визначення кількості лігніну.....	362
Робота 12.14. Визначення суми сирого філіцину у кореневищах папоротників	365
Робота 12.15. Визначення суми ксантонів	366
Робота 12.16. Визначення вмісту фурокумаринів у плодах	368
Робота 12.17. Визначення суми хромонів у плодах амі зубної.....	370
Робота 12.18. Визначення суми антоціанів	371
Робота 12.19. Визначення суми флавоноїдів у рослинному матеріалі	373
Робота 12.20. Визначення суми флавоноїдів в листі рослин	375
Робота 12.21. Визначення вмісту суми флавонолів у листі рослин	376
Робота 12.22. Визначення суми танінів у листі рослин	378
Робота 12.23. Визначення вмісту дубильних речовин.....	380
Робота 12.24. Визначення вмісту кофеїну у рослинному матеріалі.....	383
Список літератури	385
Додаток А. Атомні та молекулярні маси.....	388
Додаток Б. Матеріали, необхідні для проведення обчислень	399
Додаток В. Приготування деяких буферних розчинів.....	403

Навчальне видання

Приседський Юрій Георгійович

ВЕЛИКИЙ ПРАКТИКУМ З ФІЗІОЛОГІЇ ТА БІОХІМІЇ РОСЛИН (БІОХІМІЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ)

Навчальний посібник

Видання друге, перероблене та доповнене

Редактор І. М. Колесникова
Технічний редактор О. К. Гомон

Підписано до друку 20.12.2022.
Формат 60х84/16. Папір офсетний. Друк цифровий.
Друк. арк. 26,1. Умов. друк. арк. 24,3.
Наклад 100 прим. Зам. № 2275/1.

Віддруковано ФОП Корзун Д.Ю. з оригіналів замовника.
Свідоцтво про державну реєстрацію фізичної особи-підприємця
серія В02 № 818191 від 31.07.2002 р.

Видавець ТОВ «ТВОРИ».
Свідоцтво про внесення суб'єкта видавничої справи
до Державного реєстру видавців, виготовлювачів і розповсюджувачів
видавничої продукції серія ДК № 6188 від 18.05.2018 р.
21034, м. Вінниця, вул. Немирівське шосе, 62а.
Тел.: 0 (800) 33-00-90, (096) 97-30-934, (093) 89-13-852, (098) 46-98-043.
e-mail: info@tvoru.com.ua
<http://www.tvoru.com.ua>

друкарня-видавництво



ТВОРИ
творимо разом

ISBN 978-617-552-335-3



9 786175 523353

www.tvoru.com.ua